

Einfluss der zeitlichen und räumlichen Fokussierung auf die strahlenbiologische Wirksamkeit von Protonen

Dipl.–Phys. Christoph Greubel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Luft– und Raumfahrttechnik der
Universität der Bundeswehr München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

- Vorsitzender: Prof. Dr.–Ing. Markus Klein
1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Günther Dollinger
2. Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Katia Parodi

Die Dissertation wurde am 05.06.2013 bei der Universität der Bundeswehr München
eingereicht und durch die Fakultät für Luft– und Raumfahrttechnik am 12.06.2013
angenommen. Die mündliche Prüfung fand am 18.10.2013 statt.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von auf Nanosekunden gepulster (zeitlich fokussierter) Dosisdeposition, im zweiten Teil von auf Submikrometer (räumlich) fokussierter Dosisdeposition von 20 MeV Protonen auf die relative biologische Wirksamkeit, RBE, studiert.

Die Effekte gepulster Bestrahlung auf Nanosekunden Zeitskala sind vor allem für eine mögliche Anwendung der Laserbeschleunigung von Ionen in der Tumorthherapie, welche die Dosisdeposition auf einer Nanosekunden Zeitskala erwarten lässt, von Bedeutung. Zur Untersuchung wurde die Wachstumsverzögerung von zwei menschlichen Plattenepithelkarzinomen aus dem Mund- und Rachenraum, FaDu und XF354, im Mausmodell nach Bestrahlung mit einer Fraktion von nominell 20 Gy gemessen.

In Ermangelung geeigneter lasergetriebener Ionenstrahlen wurde hierzu mittels konventioneller Technik am Rasterionenmikroskop SNAKE am Münchener Tandembeschleuniger ein auf 1,3 ns (volle Halbwertsbreite) gepulster 20 MeV Protonenstrahl mit einer Fluenz pro Einzelpuls von bis zu 10^9 cm^{-2} präpariert, sowie ein kontinuierlicher Protonenstrahl zur Dosisdeposition auf Millisekunden Zeitskala für direkte Vergleichsmessungen. Die Bestrahlung der maximal 4 mm tiefen und 7 mm im Durchmesser messenden Tumore erfolgt voxelweise, wobei die komplette Fluenz eines Voxels mit einem Nanosekunden Puls appliziert wird. An jedem Punkt im Tumor deponiert mindestens ein Puls eine Dosis zwischen 1,0 Gy und 2,7 Gy.

Der RBE für die Wachstumsverzögerung von FaDu Tumoren bezüglich 6 MV Röntgenstrahlung wurde nach kontinuierlicher Dosisdeposition zu $1,10 \pm 0,14$, nach gepulster Dosisdeposition zu $1,22 \pm 0,17$ gemessen. Auch für die XF354 Tumore konnte kein signifikanter Unterschied in der Wachstumsverzögerung gemessen werden. Die Messungen zeigen keine Anzeichen für eine geänderte Wirksamkeit von Nanosekunden gepulster Dosisdeposition.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Auswirkungen von räumlich fokussierter Dosisdeposition am Endpunkt der Induktion von dizentrischen Chromosomen und Mikrokernen untersucht. Durch die Submikrometer Fokussierung von niedrig-LET 20 MeV Protonen kann eine räumliche Dosisverteilung generiert werden, welche qualitativ jener von Schwerionen mit hohem LET ähnelt, so dass die Wirkung von dichten

render hoch-LET Strahlung modelliert werden kann. Hierzu wurden A_L-Zellen mit einer Dosis von jeweils 1,7 Gy in drei verschiedenen Modi bestrahlt: Die Bestrahlung mit Submikrometer fokussierten 20 MeV Protonen folgt einer $5,4\text{ }\mu\text{m} \times 5,4\text{ }\mu\text{m}$ Matrix, wobei 117 Protonen pro Matrixpunkt appliziert werden. Die Bestrahlung mit 55 MeV Kohlenstoffionen erfolgt im selben Muster mit je einem Ion pro Matrixpunkt. Zufällig verteilte 20 MeV Protonen werden mit einer Fluenz von $4,01\text{ }\mu\text{m}^{-2}$ appliziert.

Der RBE für die Induktion von Mikrokernen steigt durch die Fokussierung der Protonen von $1,28 \pm 0,07$ nach zufällig verteilter Protonenbestrahlung auf $1,48 \pm 0,07$ nach fokussierter Protonenapplikation, der RBE für die Induktion von dizentrischen Chromosomen steigt von $1,41 \pm 0,14$ auf $1,92 \pm 0,15$. Der von Kohlenstoffionen induzierte RBE ist mit $2,20 \pm 0,09$ für Mikrokerne und $3,21 \pm 0,27$ für dizentrische Chromosomen nochmal deutlich höher.

Die signifikante Erhöhung der Induktion von Chromosomenaberrationen alleine durch die Fokussierung der Protonen und damit der räumlichen Dosisverteilung zeigt, dass die räumliche Dosisverteilung für den RBE maßgeblich ist. Die Experimente stellen somit die erste experimentelle Bestätigung der Grundannahme des Local Effect Models dar, welches in der Tumorthherapie mit schweren Ionen zur Modellierung des RBE für die Dosisplanung verwendet wird. Rechnungen mit dem Local Effect Model III zeigen jedoch, dass dieses den RBE für die Endpunkte der Chromosomenaberrationen für die drei Bestrahlungsmodi zwar qualitativ, nicht aber quantitativ beschreiben kann.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	iii
1 Einleitung	1
2 Strahlenwirkung energetischer Ionen	7
2.1 Dosisdeposition energetischer Ionen	7
2.1.1 Linearer Energietransfer	7
2.1.2 Radiale Dosisverteilung	10
2.2 DNA-Schädigung	11
2.2.1 Chromosomenaberrationen	13
2.2.2 Strahlenwirkung auf Tumore	16
2.3 Relative biologische Wirksamkeit	18
2.4 Modellierung der relativen biologischen Wirksamkeit	20
2.4.1 Das Local Effect Model	21
3 Bestrahlung biologischer Proben an SNAKE	27
3.1 Mikrostrahlpräparation	27
3.2 Zellbestrahlungsaufbau	29
3.3 Präparation abgeählter Ionen	30
4 Biologische Wirksamkeit von Nanosekunden Protonenpulsen	33
4.1 Maus- und Tumormodell	33
4.2 Bestrahlungsmethodik	34
4.2.1 Präparation eines Nanosekunden gepulsten Protonenstrahls zur Tumorbestrahlung	35
4.2.2 Präparation eines Protonenstrahls zur kontinuierlichen Dosisap- plikation	39
4.2.3 Bestrahlungsaufbau	39
4.2.4 Dosisplanung	41
4.2.5 Bestrahlungsverifikation	47

4.2.6	Bestrahlungsablauf	49
4.3	Durchgeführte Tumorbestrahlungen	51
4.4	Wachstumsverzögerung nach gepulster bzw. kontinuierlicher Dosisappli- kation	53
4.4.1	Wachstum unbestrahlter Kontrolltumore	53
4.4.2	XF354	55
4.4.3	FaDu	55
4.4.4	Vergleich mit Röntgenbestrahlung	58
4.5	Diskussion	60
5	RBE Erhöhung durch fokussierte Protonenbestrahlung	65
5.1	Motivation	65
5.2	Versuchsdurchführung	67
5.3	Messung von Chromosomenaberrationen	69
5.3.1	Häufigkeit der Aberrationen	70
5.3.2	Relative biologische Wirksamkeit	72
5.3.3	Einfluss der Dosisverteilung auf die Aberrationshäufigkeit	73
5.3.4	Dispersionsindizes der Häufigkeitsverteilungen	76
5.4	Modellierung mit dem Local Effect Model	79
5.5	Diskussion	84
6	Ausblick	87
	Literaturverzeichnis	91
	Publikationsliste	99
	Danksagung	105

Kapitel 1

Einleitung

Alleine in Deutschland erkranken pro Jahr fast eine halbe Million Menschen an Krebs [KID12], wovon etwa die Hälfte ausschließlich oder begleitend mit Strahlentherapie, vor allem mit Röntgen- bzw. Gammabestrahlung, behandelt wird [For03, Sch06]. Ziel der kurativen Therapie ist die Kontrolle des Tumors, also dessen Weiterwachsen zu verhindern, was durch Deposition einer auf die Tumorart abgestimmten Dosis im Tumor erreicht werden soll. Da die Kontrollwahrscheinlichkeit mit höherer Dosis zunimmt, wäre — zumindest theoretisch — mit entsprechend hoher Dosis jeder Tumor kontrollierbar. Allerdings ist es nicht möglich Dosis nur selektiv im zu bestrahlenden Tumor, nicht aber im umliegenden Gewebe zu deponieren. Akute sowie langfristige Nebenwirkungen limitieren die maximal applizierbaren Dosen.

1946 schlug Robert R. Wilson vor, inspiriert von der Beschleunigerentwicklung jener Zeit, Ionen zur Tumorthherapie zu verwenden [Wil46]. Während die Dosisdeposition von Photonen, abgesehen von oberflächennahen Effekten, exponentiell mit der Tiefe abfällt, steigt diese für geladene Teilchen bis kurz vor Ende ihrer Reichweite an. In Abb. 1.1 ist der lineare Energieübertrag (LET, englisch: „linear energy transfer“), der Energieübertrag eines Ions auf das Target normiert auf die Weglänge, gegen die restliche Reichweite für Protonen, Kohlenstoff- und Eisenionen aufgetragen. Das Maximum der Energiedeposition liegt nur wenige Mikrometer vor Ende der Reichweite. Diese charakteristische Tiefendosisverteilung erlaubt eine konformere Bestrahlung des Tumors. Wegen der endlichen Reichweite der Ionen wird kaum Dosis hinter dem Tumor deponiert und durch das inverse Tiefendosisprofil ist die Dosis im Eingangskanal prinzipiell geringer als im Zielvolumen. Die Photonentherapie kann durch Applikation von mehreren Bestrahlungsfeldern aus verschiedenen Richtungen ebenfalls eine Dosisüberhöhung im Tumor realisieren, das Verhältnis von im Tumor deponierter Energie und insgesamt im Patienten deponierter Energie bleibt jedoch ungünstiger.

Schwerere Ionen, wie z. B. Kohlenstoffionen, erlauben wegen der im Vergleich zu

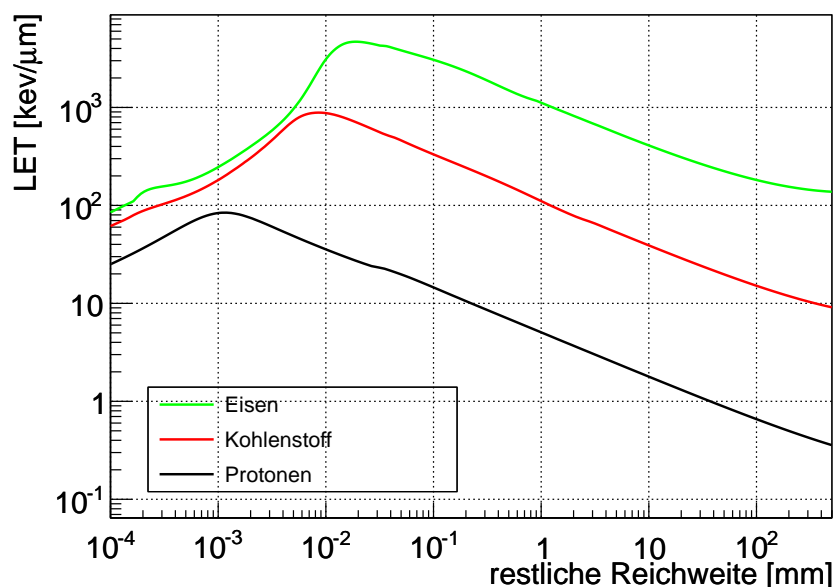


Abbildung 1.1: LET von Protonen, Kohlenstoff- und Eisenionen gegen die restliche Reichweite in doppellogarithmischer Auftragung berechnet mit SRIM [Zie]. Das LET-Maximum liegt nur wenige Mikrometer vor Ende der Reichweite.

Protonen geringeren Aufstreuung, sowohl in als auch senkrecht zur Strahlrichtung, eine gesteigerte Konformität der Bestrahlung [Tob71]. Das eigentliche Potential von schweren Ionen in der Strahlentherapie liegt jedoch in ihrer erhöhten und vor allem vom LET abhängigen Wirksamkeit [Kra00].

Zur Beschreibung der Effektivität von Strahlenqualitäten dient das Konzept der relativen biologischen Wirksamkeit (RBE, englisch: „relative biological effectiveness“). Der RBE normiert die Dosis, welche nötig ist um einen bestimmten Effekt zu induzieren, auf die entsprechende Dosis einer Referenzstrahlung, meist Röntgen- oder Gammastrahlung.

Für Ionen beobachtet man bezüglich der meisten relevanten Endpunkte eine Abhängigkeit des RBE vom linearen Energieübertrag. Bezüglich des Endpunkts des Zellüberlebens findet man für niedrig-LET Strahlung, LET kleiner etwa 10 keV/μm, RBE-Werte nahe 1. Für hoch-LET Strahlung, LET größer etwa 10 keV/μm, steigt der RBE zunächst mit dem LET an und erreicht das Maximum bei etwa 150 keV/μm. Bei größeren LET-Werten fällt der RBE wieder ab (vgl. z. B. [And09]), da hier bei einem Zellkernstreffer mehr Energie deponiert wird als zur Inaktivierung der Zelle notwendig ist.

Die LET-Abhängigkeit des RBE wird für die Therapie genutzt. Aus Abb. 1.1 wird ersichtlich, dass der maximale LET von Protonen bei 80–90 keV/μm liegt und so ein erhöhter RBE nur wenige Mikrometer vor Ende der Reichweite zu erwarten ist. Für Kohlenstoff liegt der LET schon einen Millimeter vor Reichweitenende über

100 keV/ μm . Der dort zu erwartende erhöhte RBE verstärkt die Wirkung des inversen Dosisprofils zusätzlich [Kra00]. Bei noch schwereren Ionen, wie z. B. Eisenionen, liegt der LET hingegen schon viele Zentimeter vor Ende der Reichweite im Bereich erhöhter RBE-Werte. Gegen Ende der Reichweite steigt der LET bis einige MeV/ μm an. In diesem LET-Bereich nimmt der RBE wieder ab und schwächt so die Wirkung des inversen Tiefendosisprofils.

Für die Therapieplanung ist allerdings ein detailliertes Verständnis der RBE-Abhängigkeit vom LET der Ionen nötig und zwar nicht nur für den Endpunkt des Zellüberlebens bzw. der Tumorkontrolle, sondern auch für akute sowie langfristige Nebenwirkungen. Der RBE hierfür ist im Allgemeinen ebenfalls vom LET abhängig, kann sich aber deutlich vom RBE für Zellüberleben unterscheiden. Zusätzlich hängt der RBE von der betrachteten Zelllinie bzw. dem betrachteten Gewebetyp ab. Außerdem kommt erschwerend hinzu, dass bei einer typischen Tumorbestrahlung die Dosisdeposition durch Ionen mit verschiedener Energie und somit mit verschiedenen LET-Werten geschieht.

Aufgrund des größeren LET von hoch-LET Strahlung sind zur Deposition einer bestimmten Dosis deutlich weniger Teilchentreffer notwendig als mit niedrig-LET Strahlung. In dieser Arbeit werden als niedrig-LET Strahlung 20 MeV Protonen mit einem LET in Wasser von 2,65 keV/ μm und 55 MeV Kohlenstoffionen (4,6 MeV/Nukleon) mit einem LET von 310 keV/ μm als hoch-LET Strahlung verwendet. Zur Deposition einer Dosis von 1 Gy ist eine Fluenz von 2,4 μm^{-2} für Protonen bzw. 0,02 μm^{-2} für Kohlenstoffionen notwendig. Bei einer mittleren DNA-Doppelstrangbruchausbeute von 30 pro Gray und Zelle und einer Zellkernquerschnittsfläche von etwa 140 μm^2 induziert ein Kohlenstoffion, unter Vernachlässigung eines eventuellen RBE-Faktors, im Mittel 11 Doppelstrangbrüche, während nur etwa jedes zehnte Proton einen Doppelstrangbruch induziert. Schon ein einzelnes hoch-LET Teilchen induziert somit strahlenbiologisch relevante Dosen und Effekte. Dies ändert, im Vergleich zu niedrig-LET Strahlung, sowohl den Zeitverlauf als auch die räumliche Verteilung der Dosisdeposition. In dieser Arbeit sollen beide Einflüsse auf den RBE experimentell untersucht werden um die Modellierung des RBE in Abhängigkeit des LET und eventuell weiterer Abhängigkeiten wie der Ionenenergie oder allgemein der räumlichen Dosisverteilung zu unterstützen.

Während bei der Tumorthherapie mit niedrig-LET Strahlung die Wirkung in kleinen Portionen über die Bestrahlungszeit, typischerweise im Millisekunden- bis Sekundenbereich, aufsummiert wird, ist die Wechselwirkung eines Ions mit dem Zellkern auf die Durchflugsdauer im Femtosekundenbereich begrenzt. Die anschließende Relaxation von angeregten oder ionisierten Molekülen ist nach etwa einer Picosekunde abgeschlossen [Bal00]. Die Dosis wird in kurzer Zeit und somit bei sehr hohen Dosisraten deponiert.

Mit fortschreitender Entwicklung der Laserbeschleunigung von Ionen und deren

möglichen Einsatz in der Tumorthherapie erhalten Dosisrateneffekte zusätzliche Bedeutung. Bei der Laserbeschleunigung können durch die Wechselwirkung von einzelnen, auf Mikrometer Durchmesser fokussierten und wenige Femtosekunden langen Laserpulsen mit einem Target Ionen auf MeV-Energien beschleunigt werden [Dai12]. Diese so generierten Ionenstrahlen weisen aufgrund des Beschleunigungsmechanismus eine Zeitstruktur von wenigen Femtosekunden direkt nach Erzeugung auf. Die endliche Energiebreite der Ionen resultiert allerdings in einer mit dem zurückgelegten Weg zunehmenden Pulsbreite. Für 100 MeV Protonen ergibt eine Energieunschärfe von 10 % nach drei Metern bereits eine Pulsbreite von einer Nanosekunde. Laufwegunterschiede in der Strahlführung können den Puls zusätzlich verbreitern. Der eigentliche Beschleunigungsaufbau erfordert lediglich die Fokussierung des Laserstrahls und dessen Justierung auf dem Target und kann somit sehr kompakt konzipiert werden. Dies bietet potenziell die Möglichkeit zur Bestrahlung des Tumors aus verschiedenen Richtungen, den Beschleunigungsaufbau um den Patienten herumzufahren [Bul02, Luo05, Ma09, Led10, Hof12]. Im Vergleich zu aktuellen Therapieanlagen, welche die Ionenstrahlen mittels einer Gantry mit starken Magneten ablenken, würde dies eine erhebliche Reduktion des konstruktiven Aufwands bedeuten und somit die Kosten für eine Tumorthherapieanlage mit Ionen deutlich reduzieren. Zur Beurteilung der strahlenbiologischen Eignung von laserbeschleunigten Ionenstrahlen für die Therapie ist die Untersuchung der Effekte von Nanosekunden gepulster Dosisdeposition jedoch unverzichtbar.

Im Rahmen des Exzellenzclusters MAP (Munich Centre for Advanced Photonics) wurde über mehrere Jahre eine groß angelegte Versuchsreihe zu Dosisrateneffekten sowohl auf Einzelzellebene und im Gewebeverbund, als auch im Tiermodell durchgeführt. Aktuelle laserbeschleunigte Protonenstrahlen sind zwar schon für einfache biologische Experimente nutzbar [Kra10, Yog11, Dor12, Bin12], dennoch ist deren Reproduzierbarkeit und Stabilität für eine größere Versuchsreihe und vor allem für anspruchsvollere Experimente, wie z. B. im Tiermodell, noch nicht ausreichend. Aus diesem Grund wurde mit konventionellen Mitteln ein auf eine Nanosekunde gepulster Protonenstrahl mit einer Fluenz pro Puls von bis zu 10^9 cm^{-2} am Rasterionenmikroskop SNAKE am Münchener 14 MV Tandembeschleuniger präpariert. In Kap. 4 dieser Arbeit wird sowohl diese Strahlpräparation als auch die Herausforderungen und deren Lösungen beschrieben um menschliche Tumore im Mausmodell mit einer Einzeldosis von 20 Gy mit einzelnen Protonenpulsen zu bestrahlen. Ebenso werden die Ergebnisse der Messungen der Wachstumsverzögerung diskutiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wird der Einfluss der räumlichen Dosisverteilung auf die biologische Wirksamkeit auf Zellebene untersucht. Wie oben diskutiert deponieren schon einzelne Treffer von hoch-LET Ionen Dosen in der Größenordnung von einem Gray. Dies führt für Schwerionen zu einer räumlich konzentrierten und damit höchst in-

homogenen Dosisverteilung, welche die Schlüsselrolle in der RBE-Modellierung spielt. Allerdings ist eine experimentelle Validierung dieser Modelle, vor allem des Einflusses der räumlichen Dosisverteilung, schwierig. In der Regel muss hierzu die Wirkung verschiedener Ionen mit verschiedenen Energien und/oder Kernladungszahlen und damit verschiedenen LET-Werten verglichen werden, wobei deutlich mehr Parameter als nur die räumliche Dosisverteilung geändert werden.

In Kap. 5 wird die gezielte Modifikation der räumlichen Dosisverteilung von niedrig-LET Strahlung, 20 MeV Protonen, mit Hilfe des Rasterionenmikroskops SNAKE beschrieben. Die Submikrometer Fokussierung und Applikation von abgezählten Protonen ermöglicht die Konzentration der Ionentreffer auf wenige Punkte im Zellkern und damit auch die Konzentration der Dosisdeposition um diese Punkte. Somit kann die Dosisverteilung von Schwerionen approximiert werden. Durch Verwendung derselben Ionen und derselben Energie ist es möglich, gezielt nur den Parameter der räumlichen Dosisverteilung zu modifizieren. Anhand des Endpunkts der Induktion von strukturellen Chromosomenaberrationen wird die RBE-Erhöhung durch eine inhomogene, fokussierte Dosisverteilung gezeigt und mit Vorhersagen des Local Effect Models [Sch96b, Els07, Els08, Fri12], welches zur Modellierung des RBE für die Dosisplanung in der Tumorthherapie mit schweren Ionen entwickelt wurde, verglichen.

In Kap. 2 werden die wichtigsten Grundlagen der Strahlenwirkung energetischer Ionen kurz diskutiert. In Kap. 3 wird das Rasterionenmikroskop SNAKE, woran die meisten Bestrahlungsexperimente dieser Arbeit durchgeführt wurden, kurz beschrieben.

Kapitel 2

Strahlenwirkung energetischer Ionen

2.1 Dosisdeposition energetischer Ionen

Energetische Ionen gehören wie Alpha-, Beta- und Gammastrahlung zu ionisierender Strahlung. Die Energiedeposition bei Durchgang durch Materie geschieht bei Ionen mit Energien ab einigen Megaelektronenvolt im Wesentlichen in Form elektronischer Anregung oder Ionisation und führt damit zur Zerstörung von Molekülen. Als physikalisches Maß dient die Energiedosis oder nur Dosis, welche die in einer Masse Δm deponierte Energie ΔE angibt:

$$D = \frac{\Delta E}{\Delta m} \quad (2.1)$$

Die Dosis, D , wird in der Einheit Gray, $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$, gemessen. Die Dosisdeposition geschieht nicht homogen im Target. Zum einen sind die beitragenden Prozesse statistischer Natur, so dass die in einem kleinen Volumen, Mikro- bis Nanometerskala, gemessene Dosis je nach Größe des betrachteten Volumens unterschiedlich stark fluktuiert. Diese Variation der Dosis ist Teil des Gebiets der Mikrodosimetrie (vgl. z. B. [Ros79]). Zum anderen variiert der Erwartungswert, um welchen die Dosis schwankt, sowohl in Strahlrichtung, beschrieben durch den linearen Energieübertrag, als auch senkrecht zur Strahlrichtung, beschrieben durch die radiale Dosisverteilung. Beide sollen im Folgenden eingeführt werden.

2.1.1 Linearer Energietransfer

Der lineare Energietransfer, LET , ist definiert als die Energie, ΔE , welche pro vom Ion zurückgelegter Weglänge, Δl , im umliegenden Material deponiert wird.

$$LET = \frac{\Delta E}{\Delta l} \quad (2.2)$$

Der LET hängt, aufgrund der Energieerhaltung, eng mit dem Bremsvermögen der Ionen, dem Energieverlust pro Weglänge, $\frac{dE}{dx}$, zusammen, berücksichtigt jedoch nicht den Energieverlust durch Bremsstrahlung. Beim Durchgang von Ionen durch Materie ist die Bremsstrahlung jedoch vernachlässigbar gering und das Bremsvermögen dem LET nahezu äquivalent.

Der LET variiert sowohl mit der Energie der Teilchen, als auch mit der Teilchenart über mehrere Größenordnungen. Abb. 2.1 zeigt exemplarische den LET von Protonen, Kohlenstoff-, Eisen- und Bleiionen gegen die Energie pro Nukleon, berechnet mit SRIM [Zie]. Als Targetmaterial wurde Wasser verwendet, was eine gute Näherung für biologische Materie darstellt. Der LET besitzt ein Maximum zwischen knapp 100 keV für Protonen und wenigen MeV/u für schwere Ionen. Für Energien jenseits dieses Maximums sind die Ionen vollständig ionisiert. Der Energieübertrag durch Wechselwirkung mit den Targetelektronen, der sogenannte elektronische Energieverlust, dominiert und der LET wird in guter Näherung durch die Bethe-Formel [Zie99] beschrieben:

$$-\frac{dE}{dx} = \left(\frac{e^2}{4\pi\epsilon_0} \right) \frac{4\pi n}{m_e} \frac{Z^2}{v^2} \ln \left(\frac{2m_e}{I} v^2 \right) + \text{relativistische Terme} \quad (2.3)$$

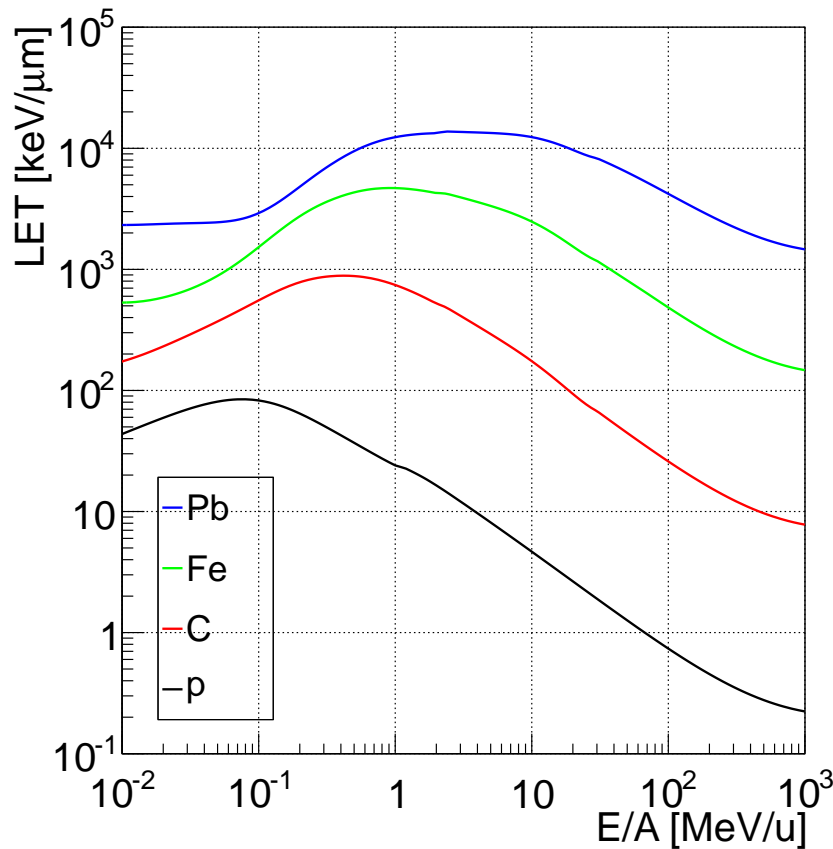


Abbildung 2.1: Linearer Energietransfer von Protonen, Kohlenstoff-, Eisen- und Bleiionen aufgetragen gegen die Energie pro Nukleon, E/A , berechnet mit SRIM [Zie].

Hierbei bezeichnet Z die Kernladung des Ions und v dessen Geschwindigkeit, n die Elektronendichte des Targetmaterials, m_e die Elektronenmasse, ϵ_0 die elektrische Feldkonstante und I das mittlere Anregungspotential des Targetmaterials.

Der LET ist dort im Wesentlichen proportional zum Quadrat der Kernladungszahl des Ions und zum Inversen seiner Energie ($\propto 1/v^2$), bevor ab etwa 1 GeV/u relativistische Effekte zu Abweichungen führen. Unterhalb der Maximumsenergie sind die Ionen nicht mehr vollständig ionisiert, die Kernladung ist abgeschirmt und somit die Stärke der Coulombwechselwirkung zwischen Ion und den Elektronen im Target reduziert. Dies führt zu einer Abnahme des LET in diesem Bereich. Im Energiebereich von wenigen keV/u trägt auch die Wechselwirkung mit den Targetatomen, der sogenannte nukleare Energieverlust, signifikant bei.

Die Tatsache, dass der Energieverlust des Ions über weite Bereiche mit abnehmender Energie steigt, führt dazu, dass der Energieverlust am Ende der Reichweite zunimmt und so ein Großteil der Energie des Ions dort deponiert wird. Die rote Kurve in Abb. 2.2 zeigt den LET in Wasser in Abhängigkeit der Tiefe eines einzigen 170 MeV Protons, welches eine Reichweite von etwa 200 mm besitzt. Der LET steigt von etwa 0,5 keV/ μm bis zum Ende der Reichweite um mehr als zwei Größenordnungen an. Die Reichweite

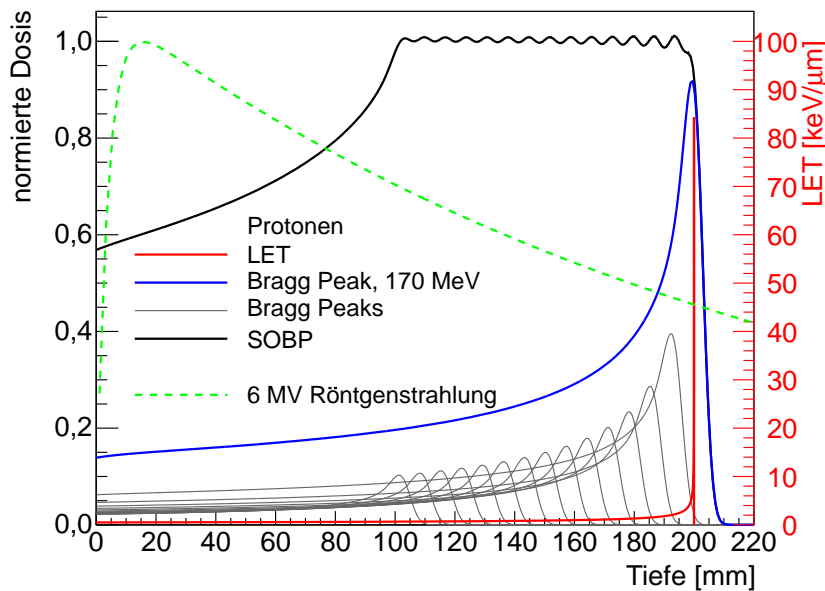


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Spread Out Bragg Peaks. Die rote Linie zeigt den LET von einem 170 MeV Proton gegen die Tiefe (rechte Skala). Blau dargestellt ist die Tiefendosisverteilung eines monoenergetischen 170 MeV Protonenstrahls (linke Skala). Schwarz ist der durch Überlagerung von Bragg Peaks unterschiedlicher Energie und Fluenz (graue Kurven) entstandene Spread Out Bragg Peak. Zum Vergleich ist die Tiefendosisverteilung von 6 MV Röntgenstrahlung skizziert.

der Ionen streut aufgrund der statistischen Natur des Energieverlusts um eine mittlere Reichweite. Die Tiefendosisverteilung von vielen 170 MeV Protonen, der sogenannte Bragg Peak, ist in Abb. 2.2 blau skizziert. Für die Tumorthherapie ist eine möglichst homogenen Dosisverteilung im Tumor erstrebenswert. Diese kann durch Überlagerung (schwarze Kurve) mehrerer Bragg Peaks unterschiedlicher Energie und Fluenz (graue Kurven) näherungsweise erreicht werden. Diese Überlagerung wird als Spread Out Bragg Peak bezeichnet.

Abb. 2.2 zeigt den entscheidenden physikalischen Vorteil von Ionenbestrahlung im Gegensatz zur weit verbreiteten Photonenbestrahlung. Die Dosisdeposition von Photonen steigt zuerst kurz an um nach einem Maximum exponentiell abzufallen. Die Lage des Maximums ist energieabhängig, für 6 MV Photonen liegt es etwa 1,5 cm hinter der Oberfläche [Kle03]. Für Ionen hingegen nimmt die Dosisdeposition mit der Tiefe zu und wird kurz vor Ende der Reichweite maximal. Somit wird kaum Dosis hinter dem Tumor deponiert. Außerdem ist die Dosisdeposition vor Erreichen des Tumors, auch bei Bestrahlung aus nur einer Richtung, kleiner als im Tumor. Für tiefliegende Tumore kann das bei Photonenbestrahlung nur durch Bestrahlung aus mehreren Richtungen erreicht werden. Eine Bestrahlung mit Protonen oder Ionen aus mehreren Richtungen reduziert bei konstanter Dosis im Tumor die im gesunden Gewebe deponierte Dosis noch weiter. Durch die charakteristische Dosisdeposition von Ionen wird weniger Energie im umliegenden Gewebe deponiert. Somit erlaubt die Ionenbestrahlung eine deutlich bessere Schonung von gesundem Gewebe [Dur10].

2.1.2 Radiale Dosisverteilung

Bei Ionisationsereignissen während der Wechselwirkung zwischen Ion und Target wird ein Teil der vom Ion abgegebenen Energie als kinetische Energie auf Sekundärelektronen übertragen. Die maximale Energie der Sekundärelektronen ist begrenzt und wird beim zentralen Stoß maximal. Je nach Geschwindigkeit des Ions liegt die maximale Reichweite dieser δ -Elektronen und damit der Bereich ihrer Energiedeposition im Nano- bis Mikrometer Bereich. Die Energiedeposition findet somit nicht nur direkt entlang der Ionenspur, sondern auch in dessen Umkreis statt. Im Gegensatz zum LET bzw. dem Bremsvermögen ist die räumliche Dosisverteilung um die Ionenspur, die radiale Dosisverteilung, nur eingeschränkt experimentell zugänglich. Neben aufwendigen Monte-Carlo-Simulationen existieren eine Reihe analytischer Modelle [But67, Cha76, Xap92, Che94, Hau06b], welche den Erwartungswert der Dosisdeposition im Abstand der Ionenspur beschreiben. Diese unterscheiden meist zwischen zwei Bereichen: dem Bereich direkt um die Ionenspur, oftmals Core genannt, und dem Bereich, in welchem die Energie durch δ -Elektronen deponiert wird, auch als Penumbra

bezeichnet. Die Penumbra-Region ist experimentell zumindest indirekt durch ortsauflösende Ionisationsmessungen in verdünntem Wasserdampf oder gewebeäquivalenten Gasen zugänglich. Die Dosis fällt hier mit dem Inversen des Abstandsquadrats bis zu einem maximalen Radius, r_{max} , ab [Var77, Var80]. Nach [Kie86] gilt für diesen:

$$r_{max} = 0,0616 \mu\text{m} (\text{MeV/u})^{-1,7} \cdot (E/A)^{1,7} \quad (2.4)$$

Für die in dieser Arbeit verwendeten Ionen, 20 MeV Protonen und 55 MeV Kohlenstoff, liegt der maximale Radius bei 10,1 μm bzw. 0,82 μm .

Im Gegensatz zur Penumbra ist der Core-Bereich Messungen nicht zugänglich. Somit sind hier Annahmen bei der Modellierung zu treffen. [Cha76] z. B. geht von einer Gleichverteilung der Energiedeposition zwischen den direkten elektronischen Anregungen durch das Ion und der δ -Elektronen bzw. deren gesamter kinetischer Energie aus. Andere, wie das weiter unten in 2.4.1.1 vorgestellte Modell, nehmen die Dosis im Core-Bereich unterhalb eines bestimmten Radius als konstant an, mit stetigem Übergang zur Penumbra.

2.2 DNA-Schädigung

Im Fall von lebenden Zellen bildet die DNA das gefährdetste Targetmolekül, da dieses in der Zelle maximal doppelt, in bestimmten Zellzyklusphasen nur einfach vorhanden ist und mit deren Beschädigung der Verlust von Erbinformationen droht. Die Schädigung erfolgt entweder durch direkte Wechselwirkung mit der Strahlung oder indirekt durch strahleninduzierte Radikale, welche ihrerseits wieder die DNA schädigen können.

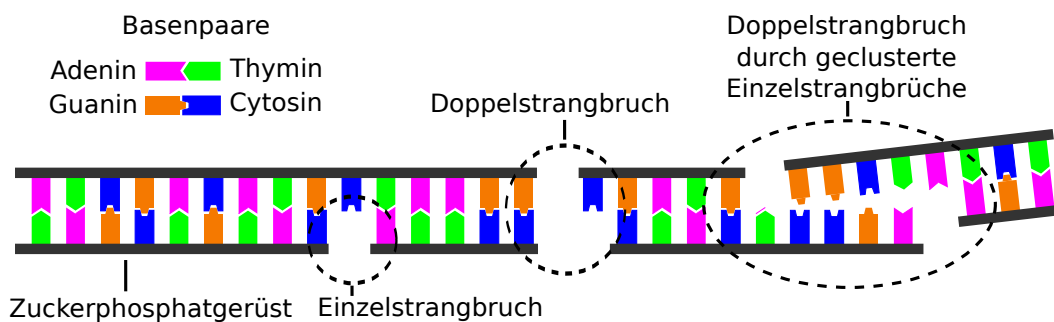


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des DNA-Doppelstrangs, bestehend aus zwei Zuckerphosphat-Strängen, welche mit einer Abfolge von Basenpaaren verknüpft sind. Ebenfalls schematisch dargestellt ist der Bruch nur eines Zuckerphosphat-Strangs, ein sogenannter Einzelstrangbruch, der Bruch beider Stränge, ein sogenannter Doppelstrangbruch und ein Doppelstrangbruch, welcher durch nahe beieinanderliegende Einzelstrangbrüche auf gegenüberliegenden Strängen entsteht.

Der Aufbau des DNA-Moleküls ist schematisch in Abb. 2.3 skizziert. Dieses ist doppelsträngig, wobei jeder Strang aus einem Zucker-Phosphatgerüst-Gerüst besteht. Die beiden Stränge werden mit einer Folge von zwei komplementären Basenpaaren, welche über Wasserstoffbrückenbindungen verknüpft sind, verbunden. Diese Abfolge der etwa 3×10^9 Basenpaare in menschlichen Zellen kodiert die Erbinformation.

Wird nur ein Strang des DNA-Doppelstrangs durchtrennt, so spricht man von einem Einzelstrangbruch (vgl. Abb. 2.3). Da die Erbinformation redundant in beiden Strängen gespeichert ist, insbesondere auch im noch intakten komplementären Strang, stellt dieser Schaden für die Zelle keine ernsthafte Gefahr dar. Die Anzahl der Einzelstrangbrüche, die pro Gray in einer Zelle induziert werden, liegt in der Größenordnung von 10^3 [Pri99].

Bei einem Doppelstrangbruch werden hingegen beide gegenüberliegende Stränge der DNA geschädigt und durchtrennt (vgl. Abb. 2.3). Doppelstrangbrüche stellen eine ernsthafte Gefahr für die Zelle dar. Zum einen droht der Verlust von Erbinformationen, falls die ursprüngliche Basenabfolge nicht wiederhergestellt werden kann. Zum anderen besteht, falls mehrere Doppelstrangbrüche in der Zelle vorliegen, durch falsches Verknüpfen der DNA-Enden die Gefahr von Chromosomenaberrationen. Für locker ionisierende Strahlung, wie hochenergetische Röntgen- oder Gammastrahlung, erwartet man in einer Zelle etwa 30 Doppelstrangbrüche pro Gray [Pri01]. Bei Experimenten mit Plasmid-DNA findet man bei hohen Dosen einen zusätzlichen quadratischen Beitrag zur Doppelstrangbruchaussbeute [vdS73]. Dieser wird erklärt durch Doppelstrangbrüche, welche durch zufällig nahe beieinanderliegende Einzelstrangbrüche auf unterschiedlichen Strängen entstehen.

Der Anteil so erzeugter Doppelstrangbrüche lässt sich entweder mittels Monte Carlo Methoden, wie in [Els07], oder für „kleine“ Dosen, wie im Folgenden beschrieben, abschätzen: Sei p_{SSB} die auf die Anzahl der Basenpaare normierte Wahrscheinlichkeit für einen Einzelstrangbruch und p_{DSB} die normierte Wahrscheinlichkeit für einen Doppelstrangbruch. Die Wahrscheinlichkeit, $p_{2\text{-SSB}}$, zwei Einzelstrangbrüche im Abstand von weniger als d Basenpaaren zu finden ergibt sich als Produkt der Wahrscheinlichkeit einen Einzelstrangbruch zu finden, p_{SSB} , und der bedingten Wahrscheinlichkeit auf dem gegenüberliegenden Strang im Bereich von $\pm d$ Basenpaaren mindestens einen Einzelstrangbruch zu finden, $1 - (1 - p)^{2d}$. Der zusätzliche Faktor $1/2$ verhindert ein doppeltes Zählen der so entstandenen Doppelstrangbrüche, $p = p_{\text{SSB}}/2$ bezeichnet die Wahrscheinlichkeit auf einer bestimmten Seite des Doppelstrangs an einer bestimmten Stelle einen Einzelstrangbruch zu finden.

$$p_{2\text{-SSB}} = \frac{1}{2} p_{\text{SSB}} [1 - (1 - p)^{2d}] \stackrel{p \ll 1}{\approx} \frac{d}{2} (p_{\text{SSB}})^2 \quad (2.5)$$

Die Näherung, durch Taylorentwicklung bis zur ersten Ordnung, ist gültig für:

$$p_{SSB} \ll 1 \quad (2.6)$$

Geht man wie [Els07] von $y_{SSB} = 1250 \text{ Gy}^{-1}$ Einzelstrangbrüchen und $y_{DSB} = 30 \text{ Gy}^{-1}$ Doppelstrangbrüchen pro Zellkern und Gray aus, so ergibt sich normierte Wahrscheinlichkeit für einen Einzelstrangbruch zu $p_{SSB} = y_{SSB}/g \cdot D$ bzw. für einen Doppelstrangbruch zu $p_{DSB} = y_{DSB}/g \cdot D$. Wobei $g = 6,5 \times 10^9$ die Größe des (diploiden) menschlichen Genoms bezeichnet. Die Bedingung, Gl. 2.6, für die Näherung in Gl. 2.5 ist mit diesen Annahmen äquivalent zu $D \ll 2g/y_{SSB} \approx 10^6 \text{ Gy}$.

Der Verhältnis der durch diesen Mechanismus zusätzlich erzeugten Doppelstrangbrüche zur linearen Dosis–Doppelstrangabschätzung von p_{DSB} ergibt sich zu:

$$q = \frac{p_{2-SSB}}{p_{DSB}} = \frac{d}{2g} \frac{(y_{SSB})^2}{y_{DSB}} D = 1,0 \times 10^{-4} \text{ Gy} \cdot D \quad (2.7)$$

Für den Zahlenwert wurde, wie auch in [Els07], angenommen, dass zwei Einzelstrangbrüche im Abstand von weniger als 25 Basenpaaren einen Doppelstrangbruch bilden. Bei 100 Gy liegt der zusätzliche Anteil von Doppelstrangbrüchen bei nur einem Prozent. Bei $1,0 \times 10^4 \text{ Gy}$ ist der quadratische Anteil genauso groß wie der lineare Anteil.

Solch hohe Dosen sind gemittelt über den Zellkern kaum von Bedeutung, da die Zelle nach einer solchen Bestrahlung mit hoher Wahrscheinlichkeit getötet wird. In der Spur von Ionen treten lokal jedoch solch hohen Dosen auf (vgl. Kap. 2.4.1.1) und tragen so durch zusätzliche Doppelstrangbrüche zur erhöhten Wirksamkeit von Ionen bei.

2.2.1 Chromosomenaberrationen

Neben einer unvollständigen oder mit Verlust von DNA-Sequenzen verbunden Reparatur von Doppelstrangbrüchen besteht bei mehreren Doppelstrangbrüchen in einem Zellkern zusätzlich die Gefahr von Chromosomenaberrationen. Diese entstehen, falls nicht die zueinander passenden Enden, sondern Enden von verschiedenen Chromosomen miteinander verbunden werden [Sav76]. Als Endpunkte zur Quantifizierung der Wirkung unterschiedlicher Bestrahlungsqualitäten werden in dieser Arbeit Mikrokerne und dizentrische Chromosomen verwendet.

Messgröße hierbei ist die Häufigkeitsverteilung dieser Aberrationen, welche näherungsweise einer Poisson-Verteilung folgt. Zur Charakterisierung dient zum einen der Mittelwert, y , d.h. die Häufigkeit der Aberration. Die Dosisabhängigkeit des Mittelwerts wird normalerweise mit einem linearquadratischen Modell, $y = c + \alpha D + \beta D^2$, beschrieben. Zur Bewertung der Verteilungsform wird der Dispersionsindex, der Quotient aus Varianz und Mittelwert der Verteilung, $w = \sigma_y^2/y$, verwendet. Für eine

Poisson-Verteilung ist dieser Parameter eins. Sind große Aberrationsanzahlen im Vergleich zur Poisson-Verteilung überrepräsentiert, so ist der Dispersionsindex größer eins, sind große Aberrationsanzahlen unterrepräsentiert, ist dieser kleiner eins.

2.2.1.1 Dizentrische Chromosomen

Dizentrische Chromosomen entstehen, falls Enden von zwei Chromosomenbruchstücken verknüpft werden, welche jeweils ein Zentromer enthalten [Sav76]. Die übrigen beiden Bruchstücke ohne Zentromer bilden meist ein azentrisches Fragment. Dizentrische Chromosomen sind in der Metaphase der Mitose erkennbar. Im kondensierten Zustand besitzen diese Chromosomen nicht die typische X-Form, sondern aufgrund der zwei Zentromere die Form zweier „X“, wobei jeweils zwei Enden mit dem anderen „X“ verbunden sind (vgl. Abb. 2.4).

Zum Auszählen der dizentrischen Chromosomen in dieser Arbeit wurden die bestrahlten Zellen auf der Zellträgerfolie zuerst ausgestant und mit Trypsin abgelöst. In den letzten vier Stunden der 20 Stunden Inkubationszeit wird Colcemid zugegeben, welches die Mitose in der Metaphase blockt, so dass sich hinreichend viele Metaphasen anreichern können. Eine genaue Beschreibung der Prozessierung der Zellen zum Auszählen der dizentrischen Chromosomen ist in [Sch12] zu finden.

Für niedrig-LET Strahlung sind die Anzahl der dizentrischen Chromosomen unterhalb weniger Gray Poisson-verteilt [Vir81, Edw79]. Die Dosiseffektkurve, $y(D)$, der Anzahl zeigt bei Dosen oberhalb einiger Gray ein Sättigungsverhalten. Sie folgt nicht mehr einem linearquadratischen Modell, sondern die Steigung geht mit zunehmender Dosis gegen Null. Zum einen ist davon auszugehen, dass stark geschädigte Zellen im Zellzyklus verlangsamt oder gar gestoppt werden, wodurch nur wenige stark geschädigte Zellen mit tendenziell großer Anzahl von Aberrationen die Metaphase erreichen [Haa77]. Desweiteren ist aufgrund der endlichen Anzahl von Chromosomen die Wahrscheinlichkeit, dass die Kombination von zwei Fehlverknüpfungen, welche jede für sich

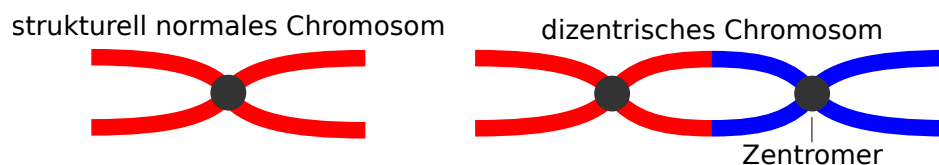


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung eines strukturell normalen Chromosoms (links) und eines dizentrischen Chromosoms (rechts) im kondensierten Zustand in der Metaphase. Dizentrische Chromosomen entstehen durch Fehler bei der Doppelstrangbruchreparatur, wenn fälschlicherweise zwei Chromosomenbruchstücke mit jeweils einem Zentromer verknüpft werden.

in ein dizentrisches Chromosom resultieren würde, wieder zu zwei monozentrischen Chromosomen führt, von Null verschieden und nimmt mit der Anzahl der Fehlverknüpfungen zu [Sav69]. Beide Effekte führen zum Abknicken der Dosiseffektkurve und werden von einer Abnahme des Dispersionsindex begleitet, da große Aberrationsanzahlen seltener vorkommen [Vir81].

Für hoch-LET Strahlung weisen die gemessenen Verteilungen tendenziell einen Dispersionsindex von größer eins auf [Vir81, Edw79].

2.2.1.2 Mikrokerne

Strahleninduzierte Mikrokerne entstehen aus azentrischen Chromosomenfragmenten. Während der Anaphase werden die Chromosomen durch den Spindelapparat an deren Zenromer zu den Polen des Zellkerns gezogen um in die Tochterkerne inkorporiert zu werden. Eventuell vorhandene azentrische Chromosomenbruchstücke bleiben mitunter zurück. Ein nicht unerheblicher Anteil dieser Fragmente wird nicht in einen der Tochterkerne eingebaut, sondern es bildet sich ein meist deutlich kleinerer Kern, ein sogenannter Mikrokern [Sch75]. Mikrokerne können auch durch Defekte des Spindelapparates entstehen, in diesem Fall befinden sich ganze Chromosomen in den Mikrokernen. Defekte des Spindelapparates sind bei der Behandlung der Zellen in dieser Arbeit nicht zu erwarten und würden durch eine erhöhte Mikrokernanzahl der unbestrahlten Kontrollproben auffallen, so dass in dieser Arbeit die Mikrokernanzahl als ein Maß für den genetischen Schaden dient.

Zur quantitativen Bestimmung der Mikrokerninduktion, wie in Kap. 5 verwendet, wird durch die Zugabe von Cytochalasin B direkt nach Bestrahlung nur die Zellteilung, nicht aber die Zellkernteilung, unterbunden. Somit befinden sich nach einer Zellkernteilung zwei Kerne und eventuelle Mikrokerne innerhalb einer Zelle. Durch Anfärben von DNA und Zytoplasma in verschiedenen Farben können beide Zellkerne und eventuell vorhandene Mikrokerne in derselben Zelle sichtbar gemacht und die Verteilung der Mikrokernanzahl der Zellen in diesem sogenannten Cytochalasin B Block (CB Block) ausgezählt werden. Eine detaillierte Beschreibung der Prozessierung ist in [Sch12] zu finden.

Die Häufigkeitsverteilungen von Mikrokernen weisen tendenziell einen Dispersionsindex größer eins auf [Hub94, Vra94]. Analog zum Endpunkt der dizentrischen Chromosomen führt die Zellzyklusverzögerung von stark geschädigten Zellen zu einem Sättigungseffekt oberhalb von wenigen Gray [Wut98]. Desweiteren nimmt mit steigender Zahl azentrischer Fragmente die Wahrscheinlichkeit zu, dass mehr als ein Fragment im Mikrokern eingeschlossen ist [Vra94, Wut98]. Beide Effekte führen zu einer Sättigung der Dosiseffektkurve, welche von einer Reduktion des Dispersionsindex begleitet wird.

2.2.2 Strahlenwirkung auf Tumore

Die zellschädigende Wirkung ionisierender Strahlung wird zur Therapie von soliden Tumoren genutzt um deren Wachstum zu verlangsamen oder im Idealfall gänzlich zu stoppen. Bei der Bestrahlung ist die Dosisdeposition in und damit die Schädigung von gesundem, den Tumor umgebenden Gewebe meist unvermeidlich. Das primäre Ziel ist die Kontrolle des Tumors, d.h. sein Wachstum zu stoppen, wozu eine ausreichende Dosis möglichst homogen im Tumor zu deponieren ist. Daneben ist die in gesundem Gewebe deponierte Dosis zu minimieren um dort akute, wie auch langfristige Nebenwirkungen, z. B. strahleninduzierte Sekundärtumore, zu minimieren. Auch wenn der Tumor nicht vollständig kontrolliert wird, ist die Bestrahlung zumindest mit einem Volumenrückgang verbunden, was zur palliativen Behandlung genutzt wird.

2.2.2.1 Tumorkontrolle

Zur Beurteilung verschiedener Strahlungsqualitäten oder Behandlungsformen ist primär die Tumorkontrollwahrscheinlichkeit von Interesse. In dieser Arbeit wird das Poisson-Modell (vgl. [Ben97]) zur Modellierung der Kontrollwahrscheinlichkeit, $p(D)$, in Abhängigkeit der Dosis, D , verwendet. Dieses Modell basiert auf der Annahme, dass zur erfolgreichen Tumorkontrolle alle sogenannten klonogenen Tumorzellen abgetötet werden müssen. Schon eine einzige überlebende klonogene Tumorzelle ließe den Tumor wieder wachsen. Zusätzlich wird eine exponentielle Dosisabhängigkeit der Zellüberlebenswahrscheinlichkeit, $p_{\text{Überleben}}(D) = e^{-\alpha D}$, angenommen, so dass bei N bestrahlten klonogenen Tumorzellen im Mittel $Ne^{-\alpha D}$ Zellen überleben. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei dieser mittleren Anzahl überlebender klonogenen Zellen keine überlebt, ist nach der Poisson-Statistik gegeben durch:

$$p(D) = \exp[-N \exp(-\alpha D)] \quad (2.8)$$

Der sogenannte TCD_{50} Wert (englisch: „tumor control dose“) beschreibt die Dosis, bei welcher die Tumorkontrollwahrscheinlichkeit gerade 50 % beträgt, $p(TCD_{50}) = 0,5$. Diese ergibt sich aus Gl. 2.8 zu:

$$TCD_{50} = \frac{1}{\alpha} \ln \left(\frac{N}{\ln 2} \right) \quad (2.9)$$

Die Steigung der Kurve bei dem TCD_{50} Wert beträgt:

$$a = \left. \frac{dp(D)}{dD} \right|_{D=TCD_{50}} = \alpha \frac{\ln 2}{2} \quad (2.10)$$

Die Kurve aus Gl. 2.8 kann auch durch die beiden experimentell zugänglichen Größen a und TCD_{50} folgendermaßen beschrieben werden:

$$p(D) = \exp \left[-\ln 2 \cdot \exp \left(2a \frac{TCD_{50} - D}{\ln 2} \right) \right] \quad (2.11)$$

Diese Beschreibung der Kontrollwahrscheinlichkeit wird in Kap. 4.4.4 verwendet. Der Leser überzeuge sich durch Einsetzen von a und TCD_{50} in Gl. 2.8 von der Äquivalenz beider Ausdrücke.

In Abb. 2.5a ist diese Funktion für $TCD_{50} = 50$ Gy und verschiedene Wert für a geplottet.

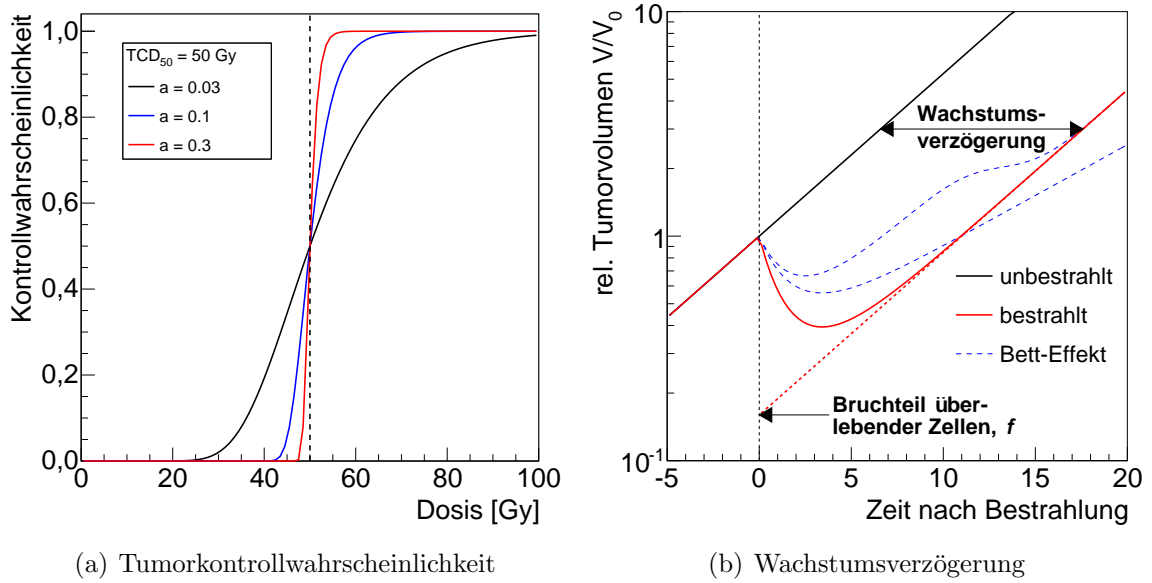


Abbildung 2.5: (a) Tumorkontrollwahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Dosis nach dem Poisson-Modell (vgl. [Ben97] und Gl. 2.11) mit $TCD_{50} = 50$ Gy (gestrichelte Linie) und $a = 0,03 \text{ Gy}^{-1}$, $0,1 \text{ Gy}^{-1}$ und $0,3 \text{ Gy}^{-1}$.

(b) Schematisch Darstellung der Wachstumskurve eines exponentiell wachsenden Tumors (schwarz) und eines zum Zeitpunkt $t = 0$ bestrahlten Tumors, wobei nur ein Bruchteil f der Tumorzellen überlebt. Wächst der Tumor vor und nach Bestrahlung mit derselben Teilungsrate, so ergibt sich die Wachstumsverzögerung, abseits der Schrumpfungsphase kurz nach Bestrahlung, als zeitlicher Versatz der Wachstumskurve des bestrahlten und unbestrahlten Tumors. Die blau gestrichelten Kurven illustrieren die Auswirkungen des Tumor-Bett-Effekts durch Abweichungen dieses Wachstumsverhaltens aufgrund der Bestrahlung des den Tumor umgebenden Gewebes.

2.2.2.2 Wachstumsverzögerung

Als weiterer Endpunkt zur Beurteilung von Strahlungsqualitäten wird in dieser Arbeit die Wachstumsverzögerung verwendet. Hierunter versteht man die Zeit, welche ein nicht kontrollierter Tumor nach Bestrahlung zusätzlich benötigt um das n -fache des Volumens, V_0 , zum Bestrahlungszeitpunkt, $t = 0$, zu erreichen. Dies ist in Abb. 2.5b veranschaulicht. Geht man von einem exponentiellen Tumorwachstum, $V(t) = V_0 \exp(t/\tau)$,

aus, so überlebt die Bestrahlung nur ein Bruchteil, f , der Tumorzellen, welche nach Bestrahlung in erster Näherung mit selber Teilungsrates weiter wachsen. So wächst der Tumor, nach kurzzeitigem Volumenrückgang, ebenfalls wieder exponentiell mit unveränderter Wachstumsrate $1/\tau$ weiter. Ab diesem Zeitpunkt kann man das Tumolvolumen, $V_{\text{bestrahlt}}$, folgendermaßen beschreiben:

$$V_{\text{bestrahlt}}(t) = f V_0 \exp(t/\tau) = V_0 \exp\left(\frac{t - \Delta t_W}{\tau}\right) \quad (2.12)$$

wobei $\Delta t_W = -\tau \ln(f)$ gilt. Der bei der Bestrahlung abgetötete Anteil der Tumorzellen, $1 - f$, resultiert also in einer zeitlichen Verschiebung der Wachstumskurve um Δt_W , der sogenannten Wachstumsverzögerung, welche um so größer ist, je mehr Tumorzellen bei der Bestrahlung abgetötet werden [Dem10].

Dieser Zusammenhang gilt qualitativ nur im Idealfall, dass der Tumor vor und nach Bestrahlung gleich schnell wächst. Da bei der Bestrahlung des Tumors unweigerlich auch das umliegende Gewebe, das sogenannte Tumorbett, mit bestrahlt und somit geschädigt wird, wächst der Tumor nach Bestrahlung eventuell langsamer. Mitunter verlangsamt sich das Wachstum auch nur zeitweise, wenn der Tumor in etwa die Größe zum Bestrahlungszeitpunkt wieder erreicht. Diese beiden Effekte des Tumorbett-Effekts [Beg80] sind in Abb. 2.5b ebenfalls skizziert. In beiden Fällen ist die Wachstumsverzögerung, Δt_W , nicht mehr von der relativen Größenzunahme, welche als Kriterium zur Bestimmung von Δt_W gesetzt wird, unabhängig. In Kap. 4 wird die Wachstumsverzögerung bei Erreichen des dreifachen Bestrahlungsvolumens bestimmt.

2.3 Relative biologische Wirksamkeit

Die Effekte ionisierender Strahlung sind zwar normalerweise dosisabhängig, dennoch ist die Dosis alleine meist nicht ausreichend um die Wirkung unterschiedlicher Strahlenarten zu beschreiben. Die ist in Abb. 2.6 am Beispiel fiktiver Zellüberlebenskurven für Röntgenstrahlung und Ionen dargestellt. Man erkennt, dass bei gleicher deponierter Dosis das Zellüberleben nach Schwerionenbestrahlung kleiner ist, als nach Röntgenbestrahlung. Oder andersherum: Zur Induktion des selben Effekts ist für Röntgenstrahlung eine höhere Dosis notwendig, als für Schwerionen. Zur Beschreibung von unterschiedlicher Wirksamkeit von Strahlungsqualitäten, dient das Konzept der relativen biologischen Wirksamkeit (RBE, englisch: „relative biological effectiveness“). Der RBE setzt die Dosis der Teststrahlung, D_{Test} , und einer Referenzstrahlung, D_{ref} , welche den selben Effekt induzieren, ins Verhältnis und ist wie folgt definiert:

$$RBE = \frac{D_{\text{ref}}}{D_{\text{Test}}} \quad (2.13)$$

Als Referenzstrahlung dient typischerweise niedrig-LET Strahlung wie 250 kV Röntgenstrahlung oder Gammastrahlung von ^{60}Co , welches beim Zerfall zwei Gammaquanten mit Energien von 1,17 MeV und 1,33 MeV aussendet.

Im Allgemeinen hängt der RBE jedoch nicht nur von der Strahlenqualität ab, sondern zusätzlich noch von weiteren Faktoren, wie z. B. dem betrachteten Endpunkt, der Dosis sowie der verwendeten Zelllinie bzw. Gewebe- oder Tiermodell.

Zur Messung der relativen biologischen Wirksamkeit ist neben Dosis und Effekt der zu testenden Strahlung auch die notwendige Dosis der Referenzstrahlung zu bestimmen. Dies geschieht im Normalfall durch Messung einer Dosiseffektkurve, welche mit einem passenden Modell gefittet wird. Die Referenzdosis ergibt sich durch Inversion der Dosiseffektbeziehung. Die Auswahl des passenden Modells hängt im Allgemeinen vom Endpunkt ab. Die Dosisabhängigkeit vieler Endpunkte wird mit einem linear-quadratischen Modell, $y(D) = c + \alpha D + \beta D^2$, beschrieben, wie z. B. die Induktion von Chromosomenaberrationen (vgl. 2.2.1). Das Zellüberleben wird meist mit Dosis-effektkurven der Form $p_{\text{Überleben}} = e^{-\alpha D - \beta D^2}$ beschrieben. Diese Beschreibung basiert auf der Annahme, dass durch Bestrahlung letale Ereignisse in der Zelle induziert wer-

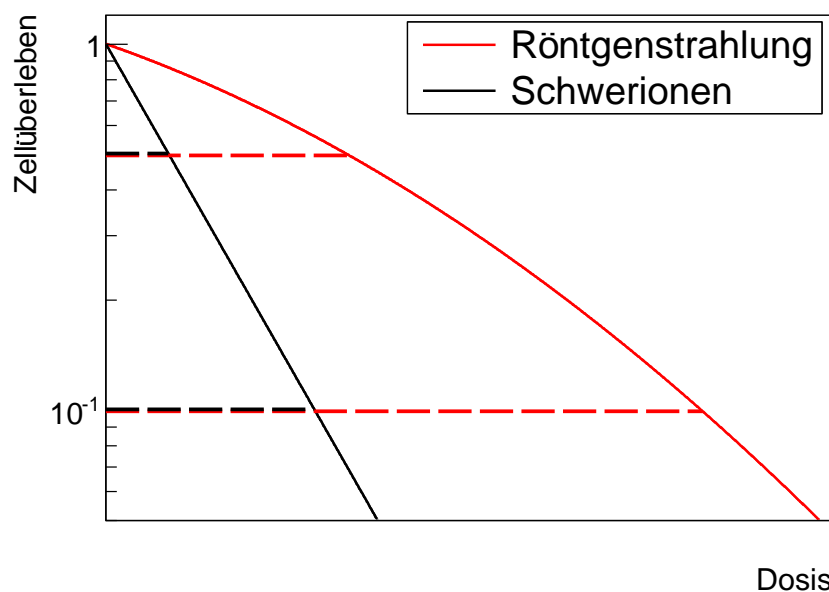


Abbildung 2.6: Veranschaulichung der RBE Definition für Zellüberleben anhand fiktiver Zellüberlebenskurven für Schwerionen, zu testende Strahlung, und Röntgenstrahlung als Referenzstrahlung. Zur Induktion des selben Effekts sind für beide Strahlungsqualitäten unterschiedliche Dosen notwendig. Die notwendigen Dosen zur Induktion von 10 % bzw. 50 % Zellüberleben sind durch die gestrichelten Linien symbolisiert. Der RBE ist definiert als Quotient der Dosis der Referenzstrahlung und der Dosis der Teststrahlung, welche notwendig sind um einen bestimmten Effekt zu induzieren. Man sieht auch, dass der RBE vom gewählten Endpunkt, 10 % oder 50 % Zellüberleben, abhängig ist.

den, wovon schon ein einziges ausreicht um das Überleben der Zelle zu verhindern. Die Dosisabhängigkeit der mittleren Anzahl der letalen Ereignisse wird wiederum mit einem linearquadratischen Modell, mit $c = 0$, beschrieben. Der obige Ausdruck beschreibt aufgrund der Poisson-Statistik die Wahrscheinlichkeit, kein letales Ereignis in der Zelle zu finden, was gleichbedeutend mit dem Überleben der Zelle ist. Die Tumorkontrollwahrscheinlichkeit (Gl. 2.8) sei an dieser Stelle als Beispiel für kompliziertere Dosisabhängigkeiten genannt.

Die Bestimmung der Unsicherheit des RBE wird je nach verwendetem Modell und gegebener Datenlage durch eine Abhängigkeit der Modellparameter erschwert. Die Korrelation äußert sich durch von null verschiedenen Nichtdiagonalelemente der Kovarianzmatrix des Fits. Diese Abhängigkeit der Parameter führt bei Anwendung von Gaußscher Fehlerfortpflanzung zur Bestimmung der RBE-Unsicherheit zu deutlicher Überschätzung dieser. Im Rahmen dieser Arbeit werden diese Parameterabhängigkeiten bei der Fehlerrechnung folgendermaßen berücksichtigt. Sei $RBE = RBE(x_1, x_2, \dots, x_n)$ die relative biologische Wirksamkeit in Abhängigkeit der Parameter x_i , mit $i \in \{1, 2, \dots, n\}$, und $\sigma_i = \sigma_{i,i}$ die Unsicherheit des Parameters x_i , sowie $\sigma_{i,j}^2$ die Kovarianz der Parameter x_i und x_j , so kann die Unsicherheit des RBE-Wertes, σ_{RBE} , nach [Nak10] wie folgt dargestellt werden:

$$\sigma_{RBE} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \frac{\partial RBE}{\partial x_i} \frac{\partial RBE}{\partial x_j} \sigma_{i,j}^2} \quad (2.14)$$

Die Gaußsche Fehlerfortpflanzung ist hierbei als Sonderfall für $\sigma_{i,j}^2 = 0$ für alle $i \neq j$, also unter Vernachlässigung der Parameterkorrelationen, enthalten.

2.4 Modellierung der relativen biologischen Wirksamkeit

Der relativen biologischen Wirksamkeit kommt vor allem bei der Tumorthherapie mit Schwerionen eine besondere Bedeutung zu. Während bei der Bestrahlungsplanung für die Protonentherapie von einem konstanten RBE von 1,1 ausgegangen wird [Pag02], ist diese Annahme für schwerere Ionen wie Kohlenstoff nicht mehr gültig. Der RBE hängt vom LET ab und der Spread Out Bragg Peak, wie in Abb. 2.2, muss nicht mehr auf konstante Dosis, sondern auf konstante Wirkung, also konstantes Produkt aus Dosis und RBE, optimiert werden. Je nach Position im Zielvolumen tragen nicht nur Ionen einer Energie bei, sondern die Dosis wird durch Ionen verschiedenster Energien und LET-Werten deponiert. Deshalb gestaltet sich eine rein experimentelle Optimierung schwierig, und der RBE muss für zufriedenstellende Ergebnisse modelliert werden.

Hierzu gibt es im wesentlichen zwei unterschiedliche Konzepte. Zum einen existieren Modelle basierend auf mikrodosimetrischen Betrachtungen, welche z. B. in Japan verwendet werden. Diese verwenden die Dosis und deren Variation auf Nano– bis Mikrometerskala als Grundlage für die RBE Beschreibung (vgl. z. B. [Haw94, Haw03, Kas06, Ina10]). Die anderen Modelle basieren auf amorphen Trackstrukturmodellen, welche lediglich den Erwartungswert der Dosis beschreiben, jedoch Fluktuationen aufgrund der statistischen Natur der Energiedeposition vernachlässigen. Hierzu ist vor allem das Local Effect Model zu nennen, welches an der Gesellschaft für Schwerionenforschung in Darmstadt entwickelt wurde. Im Folgenden wird nur das in dieser Arbeit verwendete Local Effect Model in Version III vorgestellt.

2.4.1 Das Local Effect Model

Ziel des Local Effect Models (LEM) [Sch96b, Els07, Els08, Fri12] ist es, die Überlebenswahrscheinlichkeit bestimmter Zelllinien auf Basis von Dosiseffektkurven, welche nach Röntgenbestrahlung gewonnen werden, zu beschreiben. Für die Vorhersage von Zellüberlebenswahrscheinlichkeiten dient das Konzept der letalen Ereignisse, wobei jedes letale Ereignis in einer Zelle deren Überleben verhindert. Das Local Effect Model beschreibt in einem ersten Schritt den Mittelwert der Anzahl letaler Ereignisse, S , für eine bestimmte Bestrahlung, also normalerweise für eine bestimmte Ionenart und Dosis. Die Überlebenswahrscheinlichkeit einer Zelle ist dann gleich der Wahrscheinlichkeit, dass in dieser bei gegebenem Mittelwert letaler Ereignisse, S , kein einziges letales Ereignis auftritt. Diese Wahrscheinlichkeit wird durch die Poisson–Statistik beschrieben und ergibt sich zu:

$$p_{\text{Überleben}} = e^{-S} \quad (2.15)$$

Die Grundannahme des Local Effect Models in Version I – III besagt, dass der an einem Punkt in der Zelle induzierte Schaden und damit die lokale Wahrscheinlichkeit für ein letales Ereignis nur von der Dosis an diesem Punkt abhängt. Der Gesamtschaden, also der Erwartungswert für die Anzahl letaler Ereignisse und hieraus die Zellüberlebenswahrscheinlichkeit, ergibt sich durch Aufintegration der lokalen Wahrscheinlichkeiten. Insbesondere hängt die lokale Wahrscheinlichkeit für letale Ereignisse in diesem Modell nicht von der Strahlungsart oder –qualität ab, sondern nur von der lokalen Dosis. Eine unterschiedliche Wirksamkeit ergibt sich alleine aufgrund unterschiedlicher Verteilung der Dosiswerte.

Um anhand dieser Grundannahme Effekte auf Zellbasis zu beschreiben und mit Hilfe der einfach zu messenden Röntgendaten auf Schwerionenbestrahlung extrapolieren zu können, benötigt man sowohl die Dosisverteilung im Zellkern als auch die Dosiseffektbeziehung des betrachteten Endpunkts. Da weder die Dosisdeposition nach Ionen–

bestrahlung mit Nanometer Auflösung, noch die Dosiseffektkurven bis zu Dosen von 10^6 Gy, wie sie direkt in der Spur eines Schwerions vorkommen, experimentell zugänglich sind, müssen beide modelliert werden. Die konkrete Modellierung wurde in den verschiedenen Versionen des Local Effect Model weiterentwickelt, wobei im Folgenden die Modellierung des LEM III [Els08] vorgestellt wird.

Das LEM III geht von einem zylindrischen Zellkern mit einer effektiven Querschnittsfläche aus. Diese ist typischerweise etwas kleiner als das arithmetische Mittel der Zellkernquerschnittsflächen der Zellpopulation, was unter anderem mit der Existenz von weniger strahlensensitiven Bereichen im Zellkern, z.B. Nukleoli, begründet wird [Els08].

In diesem Zellkern wird die räumliche Dosisverteilung berechnet. Bei Röntgen- bzw. Gammabestrahlung wird diese als homogen angenommen. Zur Berechnung nach Ionenbestrahlung wird das im Folgenden vorgestellte Modell für die Dosisdeposition von Ionen verwendet.

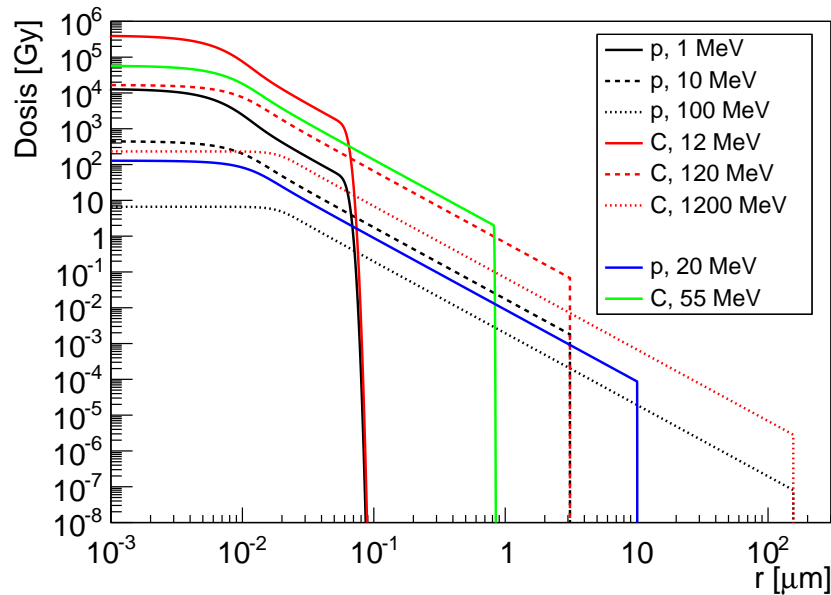


Abbildung 2.7: Dosisdeposition gegen den Abstand von der Ionenspur nach dem radialen Dosisverteilungsmodell des Local Effect Model nach Version III und IV für Protonen und Kohlenstoff mit einer Energie von 1 MeV/u, 10 MeV/u und 100 MeV/u. Zusätzlich sind die in dieser Arbeit verwendeten Ionen, 20 MeV Protonen und 55 MeV Kohlenstoff eingezeichnet. Der maximale Radius der Dosisverteilungen hängt von der Energie pro Nukleon der Ionen ab, während die Verteilung bei gleicher Energie pro Nukleon mit dem LET skaliert.

2.4.1.1 Radiale Dosisverteilung des Local Effect Model

Zur Berechnung der räumlichen Dosisverteilung geht das Local Effect Model in Version III [Els08] und IV [Fri12] von folgender anfänglichen Dosisverteilung aus:

$$\tilde{D}(\vec{r}) = \begin{cases} \lambda/r_{min}^2 & |\vec{r}| < r_{min} \\ \lambda/|\vec{r}|^2 & r_{min} < |\vec{r}| < r_{max} \\ 0 & |\vec{r}| > r_{max} \end{cases} \quad (2.16)$$

$\tilde{D}(r)$ fällt im „Penumbra“-Bereich zwischen dem minimalen, r_{min} , und maximalen Radius, r_{max} , mit dem Inversen des Abstandsquadrats ab. Der maximale Radius ist durch Gl. 2.4 gegeben, der minimale Radius, r_{min} , durch:

$$r_{min} = 40 \text{ nm} \cdot \beta \quad (2.17)$$

$\beta = v/c$ bezeichnet die Geschwindigkeit, v , des Ions in Einheiten der Lichtgeschwindigkeit, c . λ ist vom LET des Ions abhängig und ergibt sich aus der Energieerhaltung zu:

$$\lambda = \frac{LET}{\pi \rho [1 + 2 \ln(r_{max}/r_{min})]} \quad (2.18)$$

Hierbei bezeichnet ρ die Dichte des Targetmaterials.

Um der Verschmierung der Energiedeposition durch Diffusion von Radikalen Rechnung zu tragen wird die anfängliche Dosisverteilung $\tilde{D}(\vec{r})$ mit einer zweidimensionalen Gaußverteilung mit einer Breite von $\sigma = 4 \text{ nm}$ gefaltet:

$$D(\vec{r}) = \iint_{\mathbb{R}^2} \tilde{D}(\vec{r}') \exp\left(-\frac{(\vec{r} - \vec{r}')^2}{2\sigma^2}\right) d^2\vec{r}' \quad (2.19)$$

Diese radiale Dosisverteilung, $D(r)$, ist in Abb. 2.7 exemplarisch für Protonen und Kohlenstoffionen mit Energien von 1 MeV/u, 10 MeV/u und 100 MeV/u dargestellt. Deutlich ist die mit größerer Ionenenergie weiter ausgedehnte Penumbra zu erkennen. Da zum einen der LET mit der Energie abnimmt und gleichzeitig durch Zunahme des Core-Radius ein größerer Anteil der Energie in der Penumbra deponiert wird, nimmt die Maximaldosis zwischen 1 MeV/u und 100 MeV/u, sowohl für Protonen als auch für Kohlenstoff um mehr als drei Größenordnungen ab. Zusätzlich sind die radialen Dosisverteilungen der in dieser Arbeit verwendeten Ionen, 20 MeV Protonen und 55 MeV Kohlenstoff, eingezeichnet.

2.4.1.2 Dosiseffektkurve für letale Ereignisse

Die Dosiseffektkurve für letale Ereignisse wird im Rahmen des Local Effect Models unterhalb einer Schwellendosis, D_t , welche zelllinienabhängig meist in der Größenordnung von 10 Gy liegt, mit einem linearquadratischen Modell, $y(D) = \alpha D + \beta D^2$, beschrieben. Darüber gilt eine lineare Beziehung, wobei die Dosiseffektkurve in D_t stetig

differenzierbar ist. Bei sehr hohen Dosen nimmt die Anzahl der Doppelstrangbrüche überproportional mit der Dosis zu, da Doppelstrangbrüche auch durch nahe beieinander, auf gegenüberliegenden DNA-Strängen liegenden Einzelstrangbrüchen entstehen können (vgl. auch 2.2). Dies wird in [Els07] durch den Dosisverstärkungsfaktor, $\eta(D)$, beschrieben, der wie folgt definiert ist.

$$\eta(D) = \frac{N(DSB) + N(SSB + SSB = DSB)}{N(DSB)} \quad (2.20)$$

$N(DSB)$ gibt die Anzahl der Doppelstrangbrüche, $N(SSB + SSB = DSB)$ die Anzahl der zusätzlichen Doppelstrangbrüchen, welche aus nahe beieinanderliegenden Einzelstrangbrüchen entstehen. Zur Bestimmung von $N(SSB + SSB = DSB)$ und damit $\eta(D)$ werden in [Els07] 30 Doppelstrangbrüche und 1250 Einzelstrangbrüche pro Gray und Zellkern zufällig auf die Genomgröße verteilt und anschließend Paare von Einzelstrangbrüchen auf gegenüberliegenden Strängen mit einem Abstand von weniger als 25 Basenpaaren als Doppelstrangbruch gezählt. Für kleine Dosen, $D \ll 10^6$ Gy, kann $\eta(D)$ mittels der analytischen Abschätzung in Gl. 2.7 zu $\eta(D) = 1 + q$ dargestellt werden. $\eta(D)$ ist in Abb. 2.8 dargestellt.

Die Dosiseffektkurve des LEM III [Els08] ist schematisch ebenfalls in Abb. 2.8 dargestellt und parametrisiert sich wie folgt:

$$S(D) = \begin{cases} \alpha D + \beta D^2 & D < D_t \\ (\alpha + 2\beta D_t) \eta(D) D - \beta D_t^2 & D > D_t \end{cases} \quad (2.21)$$

Die Parameter α und β des linearquadratischen Modells können aus Messungen nach Röntgenbestrahlung unter der Annahme einer homogenen Dosisverteilung bestimmt werden. Die Schwellendosis, D_t , wird meist an experimentelle Daten nach Ionenbestrahlung angepasst. Eine Datenbank der Parameter der Dosiseffektkurven verschiedener Zelllinien kann hier [Bou] gefunden werden.

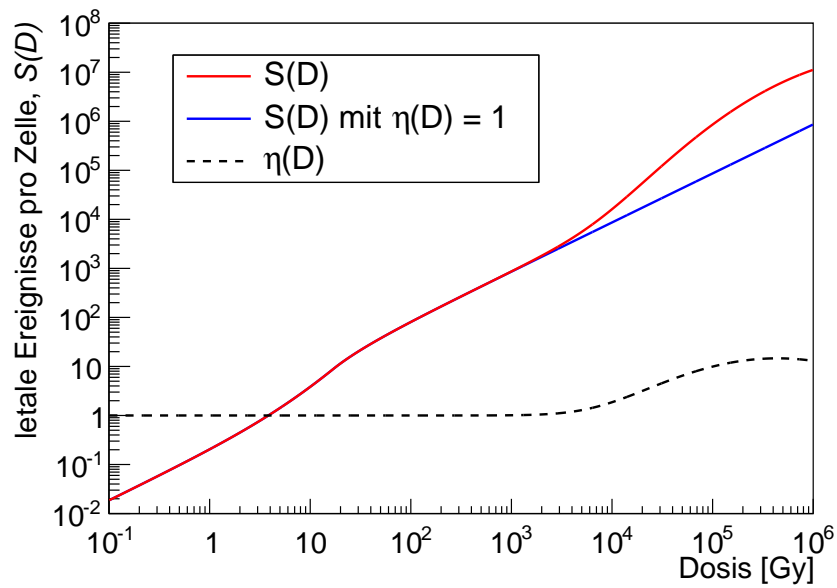


Abbildung 2.8: Die rote Linie zieht die Dosiseffektbeziehung für letale Ereignisse, $S(D)$, des Local Effect Models nach Gl. 2.21 für V79 Zellen ($\alpha = 0,184 \text{ Gy}^{-1}$, $\beta = 0,02 \text{ Gy}^{-2}$ und $D_t = 17 \text{ Gy}$ [Fri12]). Die blaue Kurve zeigt die Dosiseffektkurve unter Vernachlässigung des Dosisverstärkungsfaktors, $\eta(D)$, die schwarze gestrichelte Linie den Verlauf des Dosisverstärkungsfaktors, $\eta(D)$, welcher aus [Els07] extrahiert ist.

Kapitel 3

Bestrahlung biologischer Proben an SNAKE

Das Rasterionenmikroskop SNAKE (**S**upraleitendes **N**anoskop für **A**ngewandte **K**ernphysikalische **E**xperimente) am Münchener 14 MV Tandembeschleuniger erlaubt die Fokussierung von Ionen mit MeV Energien auf unter einen Mikrometer. Dies wird zum einen zur Materialanalytik, vor allem zum hochsensitiven, dreidimensionalen Wasserstoffnachweis mit submikrometer Auflösung verwendet [Rei04]. Darüber hinaus wird SNAKE zur mikroskopisch genauen Bestrahlung von lebenden Zellen und für eine Vielzahl weiterer strahlenbiologischer Experimente auf Einzelzellebene sowie im Gewebe- und Tiermodell verwendet und bietet wegen der vielfältigen und flexiblen Bestrahlungsmöglichkeiten ideale Voraussetzungen für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen.

Das Rasterionenmikroskop und der Zellbestrahlungsaufbau sind das Ergebnis langjähriger Entwicklung. Im Folgenden soll die Mikrostrahlpräparation an SNAKE und der Aufbau für die strahlenbiologischen Experimente kurz zusammengefasst werden. Für eine ausführliche Darstellung sei auf die an entsprechender Stelle zitierte Literatur verwiesen.

3.1 Mikrostrahlpräparation

Die Mikrostrahlpräparation ist schematisch in Abb. 3.1 dargestellt. Je nach gewünschtem Strahl stehen eine Reihe von Quellen für negativ geladene Ionen zur Verfügung. Die Ionen werden nach Vorbeschleunigung mit einer Spannung von $U_{VB} \approx 100 - 180$ kV in den Tandembeschleuniger [Ass74] eingeschossen und dort auf das mit einigen MV positiv geladene Terminal beschleunigt. In einer dünnen Kohlenstoffstripperfolie [Dol90] werden die Ionen durch Abstreifen von zwei oder mehr Elektronen positiv geladen und

so vom positiv geladenen Terminal zum Hochenergieende des Tandems ein zweites Mal beschleunigt. Die Ionenenergie hängt vom Ladungszustand, q , der Ionen hinter dem Stripper, der Vorbeschleunigungsspannung, U_{VB} , sowie der Terminalspeisung, U_T , ab und ergibt sich zu: $E = (q + 1) e U_T + e U_{VB}$, wobei e die Elementarladung bezeichnet. Die maximale Terminalspeisung liegt bei 14 MV, für stabile Bedingungen ohne Sparks bei etwa 11 MV. Die maximale Ionenenergie liegt für Protonen bei 28 MeV, für schwere Ionen bei etwa 300 MeV. Das zur Verfügung stehende Ionenspektrum deckt den LET-Bereich von 2 keV/ μm bis 10 MeV/ μm ab und ist somit ideal zur Untersuchung der meisten strahlenbiologischen Fragestellungen geeignet.

Die eigentliche Mikrostrahlpräparation beginnt nach dem 90°-Magnet, welcher die Ionen nach dem gewünschten Ladungszustand selektiert und für die Energiestabilität des Tandems verantwortlich ist. Der Ionenstrahl wird mittels Mikroschlitzen [Sch01] auf eine Größe von etwa $30 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ beschnitten und dient als Objekt für die anschließende ionenoptische Abbildung. Mittels des supraleitenden Multipoltripletts [Dat02] wird der Strahl in X-Richtung auf 1/100 und in Y-Richtung auf 1/25 verkleinert und so eine Strahlfleckgröße von unter einem Mikrometer erreicht.

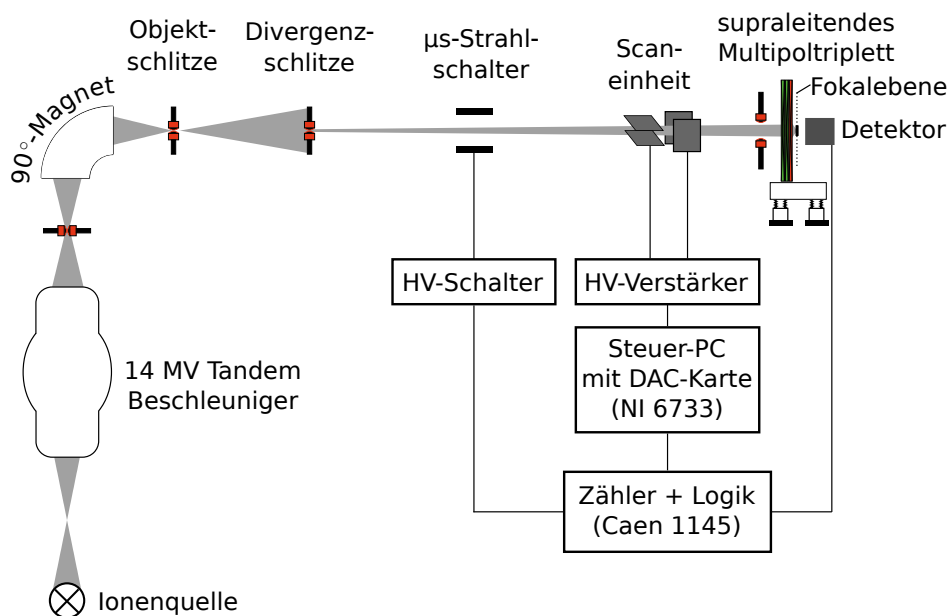


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Mikrostrahl- und Einzelionenpräparation an SNAKE. Nach Erzeugung und Beschleunigung der Ionen wird mittels Schlitzen ein etwa $30 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ großes Objekt aus dem Strahl herauspräpariert und mit der supraleitenden Linse verkleinert in die Fokalebene abgebildet. Zur Applikation abgezählter Ionen in beliebigen Mustern positioniert der Steuer-PC über die Scaneinheit den Stahl und die Zähler-/Logikeinheit öffnet den Strahlschalter solange bis die entsprechende Anzahl Ionen detektiert ist. Dies wird so lange wiederholt, bis alle Punkte des vordefinierten Musters bestrahlt sind.

Eine elektrostatische Scaneinheit erlaubt es den Mikrostrahl auf der Probe zu positionieren. Diese Scaneinheit besteht aus zwei metallischen Plattenpaaren von 65 mm Länge und 20 mm Abstand, welche wenige Zentimeter vor der supraleitenden Linse installiert sind. Die Ansteuerung mit Spannungsdifferenzen von bis zu ± 20 kV erfolgt über eine PC-Steuerkarte mit 16bit Analogausgängen (NI 6733, National Instruments Corporation, USA), welche Hochspannungsverstärker (10/10B und PD08049, Trek Inc., USA) treiben.

3.2 Zellbestrahlungsaufbau

Der Bestrahlungsaufbau, wie er in Kap. 5 genutzt wird, wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Andreas Hauptner [Hau06a] entwickelt und in einer weiteren Arbeit von Volker Hable um die Möglichkeit der Beobachtung lebender Zellen direkt am Bestrahlungsplatz erweitert [Hab11]. Abb. 3.2a zeigt eine CAD-Zeichnung des Aufbaus. Die supraleitende Linse im Helium-Badkryostat fokussiert den Strahl in die Fokalebene hinter der Zwischenkammer. Für biologische Experimente ist dort ein Strahlaustritt an

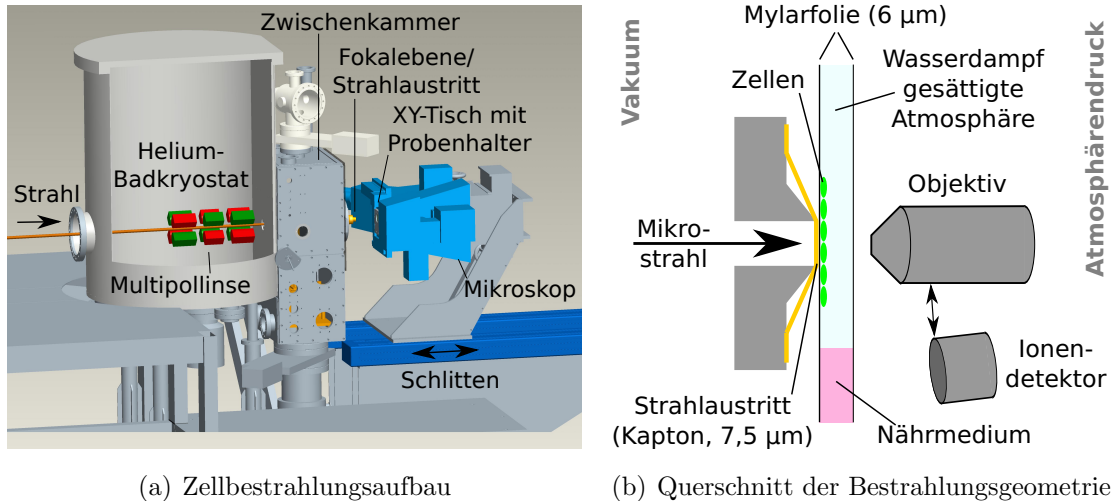


Abbildung 3.2: (a) CAD-Zeichnung des Zellbestrahlungsaufbaus an SNAKE. Die supraleitende Multipollinse fokussiert den Strahl in die Fokalebene, welche hinter der Zwischenkammer direkt am Ende des Strahlaustritts liegt. Die Zellprobe befindet sich im XY-Tisch des um 90° gekippten und in Strahlrichtung verfahrbaren inversen Mikroskops. Dies erlaubt die Visualisierung und präzise Positionierung der Probe in der Fokalebene.

(b) Querschnitt der Zellbestrahlungsgeometrie an SNAKE. Die zu bestrahlenden Zellen wachsen auf der Innenseite der den Zellcontainer verschließenden Mylarfolie, welche direkt vor dem kaptongedichteten Strahlaustritt positioniert wird. Während der Bestrahlung sind die Zellen nicht mit Medium bedeckt, was die Ionendetektion in Transmissionsgeometrie erlaubt.

Luft realisiert, wo der Ionenstrahl durch eine $7,5\text{ }\mu\text{m}$ dünne Kaptonfolie das Vakuum verlässt. Dies ermöglicht die Bestrahlung lebender Zellen unter Atmosphärendruck. Zur präzisen Positionierung und Visualisierung der biologischen Proben befindet sich hinter der Fokalebene ein inverses Mikroskop (Axiovert 200M, Carl Zeiss AG, Oberkochen), welches um 90° gekippt auf einem in Strahlrichtung verfahrbaren Schlitten montiert ist. Die Zellprobe ist auf dem XY-Tisch dieses Mikroskops montiert. Hierdurch kann die Fokalebene des Lichtmikroskops auf die Fokalebene von SNAKE justiert werden und ermöglicht Mikroskopaufnahmen der Zellen unmittelbar vor oder nach Bestrahlung in Bestrahlungsposition zu erstellen. Die Kombination aus hochauflösendem Mikroskop und Mikrometer genauem Tisch ermöglicht eine präzise Positionierung der Probe.

Die Zellproben werden in speziell entwickelten Bestrahlungsbehältern aus Edelstahl kultiviert [Hau04], welche aus einem Hohlraum mit zwei durch $6\text{ }\mu\text{m}$ dicke Mylarfolien verschlossenen Öffnungen bestehen. Abb. 3.2b zeigt einen Querschnitt durch die Bestrahlungsgeometrie, wobei nur die beiden Folien angedeutet sind. Die Zellen wachsen auf der Innenseite der strahlzugewandten Folie des Behälters und können so direkt vor dem Strahlaustritt positioniert werden um eine Strahlaufweitung durch Kleinwinkelstreuung der Ionen in der Austrittsfolie zu minimieren. Der Hohlraum im Zellbehälter ist während der Bestrahlung nur im unteren Bereich mit Zellnährmedium gefüllt. Die Zellen sind während der Bestrahlung zwar nicht mit Medium umgeben, aber die mit Wasserdampf gesättigte Atmosphäre in dem abgeschlossenen Volumen verhindert zuverlässig ein Austrocknen für mindestens 20 Minuten. Diese Konstruktion erlaubt den Ionen den Zellkontainer auf der strahlabgewandten Seite durch die zweite Mylarfolie zu verlassen. Dort werden die Ionen in einem Szintillationsdetektor mit Photomultiplierauslese, welcher im Objektivrevolver des Mikroskops montiert ist, nachgewiesen.

3.3 Präparation abgezählter Ionen

Für die meisten Experimente ist die Applikation der gewünschten Dosis mit hoher Genauigkeit ebenso wichtig wie die räumlich präzise Bestrahlung der Probe. Dies wird durch die Bestrahlung mit einzelnen, abgezählten Ionen sichergestellt. Diese Einzelionenpräparation wird durch das Zusammenspiel von Ionendetektor, schnellem elektrostatischen Strahlschalter und Scaneinheit zur Strahlpositionierung auf der Probe ermöglicht. Zur Applikation eines beliebigen Punktmusters mit einer definierten Anzahl von Ionentreffern pro Punkt wird zuerst die gewünschte Strahlposition durch die Scaneinheit angefahren. Der Strahlschalter gibt den Strahl solange frei, bis die entsprechende Anzahl Ionen im Detektor hinter der Zellprobe nachgewiesen ist. Mit dem Anfahren der nächsten Position beginnt der Ablauf von Neuem, bis alle Punkte bestrahlt sind (vgl. auch Abb. 3.1).

Die existierende Einzelionenpräparation [Hau06a] genügte den experimentellen Anforderungen zur Untersuchung räumlich fokussierter Dosisapplikation (vgl. Kap. 5) nicht. Zum einen war die maximale Frequenz, mit welcher die Matrixpunkte abgerastert werden konnten, auf wenige hundert Hertz begrenzt, zum anderen waren nur Ionenraten unter 10 kHz zuverlässig zu verarbeiten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Aufbau durch einen konzeptionell identischen, aber deutlich leistungsfähigeren ersetzt, so dass nun Punktfrequenzen bis zu 10 kHz und Teilchenraten bis zu einigen Megahertz zuverlässig verarbeitet werden können. Dies ermöglicht es die in Kap. 5 beschriebenen Bestrahlungen in einem akzeptablen Zeitrahmen durchzuführen.

Aus Geschwindigkeitsgründen ist das Zählen der Ionentreffer und das Schließen des Strahlschalters mittels eines Hardwarezählers (N1145, Caen, Italien) realisiert. Der Strahlschalter besteht aus einem Plattenpaar von 1,5 m Länge und 3 cm Abstand, welches etwa 9 m vor dem Experiment installiert ist. Durch Anlegen einer Spannungsdifferenz von etwa 1 kV werden die Ionen soweit abgelenkt, dass diese die Apertur der supraleitenden Linse nicht mehr erreichen.

Die Leistungsfähigkeit der Einzelionenpräparation hängt von der Reaktionszeit, d.h. Zeitdifferenz zwischen dem letzten Ionentreffer, woraufhin der Strahl zu stoppen ist, und dem Stop des Strahls am Target ab. Diese Reaktionszeit definiert, bei gegebener Teilchenrate, die Wahrscheinlichkeit für zusätzliche Ionentreffer, sogenannte Mehrfachtreffer. Die Reaktionszeit kann einfach mit einem digitalem Speicheroszilloskop gemessen werden, indem man auf das Signal zum Schließen des Strahlschalters triggert und das Signal des Ionendetektors darstellt. Der letzte Ionentreffer, welcher zum Schließen des Strahlschalters führt, ist kurz vor dem Trigger zu erkennen. Treffer danach sind unerwünschte Mehrfachtreffer. Der maximale Abstand der Mehrfachtreffer zum letzten Ionentreffer vor dem Trigger ist gerade die Reaktionszeit. Für 20 MeV Protonen wurde diese Reaktionszeit zu etwa 550 ns und für 55 MeV Kohlenstoffionen zu 700 ns gemessen. Die wesentlichen Beiträge hierbei sind die Ionenlaufzeit für die 9 m lange Strecke zwischen Strahlschalter und Detektor von etwa 150 ns für Protonen bzw. 300 ns für Kohlenstoff, die Schaltzeit des Hochspannungsschalters von 200 ns [Hau06a], die Signallaufzeit vom Zähler zum Strahlschalter von 50 – 100 ns sowie die Detektor- und Zählelektronik mit etwa 100 ns.

Im Mikrostrahlmodus ist die mit der elektrischen Scaneinheit zu bestrahlende Feldgröße auf etwa $500\text{ }\mu\text{m} \times 500\text{ }\mu\text{m}$ begrenzt. Größere Felder können aus mehreren solcher $500\text{ }\mu\text{m} \times 500\text{ }\mu\text{m}$ Felder durch mechanisches Verfahren der Probe zusammengesetzt werden. Der XY-Tisch des Mikroskops, auf welchem die Probe montiert ist, erlaubt die Positionierung mit einer Genauigkeit von unter $3\text{ }\mu\text{m}$. Die Ablaufsteuerung zur Automatisierung und Synchronisierung von Einzelionenpräparation und Mikroskopie läuft innerhalb der Mikroskopsteuersoftware AxisVision (Carl Zeiss AG,

Oberkochen) und wurde im Rahmen einer Studienarbeit entwickelt [Bur09].

Kapitel 4

Biologische Wirksamkeit von Nanosekunden Protonenpulsen

In diesem Kapitel wird die Wirksamkeit von Nanosekunden Protonenpulsen auf menschliche Tumore im Mausmodell untersucht. Der erste Teil beschreibt die notwendige Methodik um Tumore im Mausmodell mit Nanosekunden Protonenpulsen und einer Fluenz pro Puls von bis zu 10^9 cm^{-2} zu bestrahlen. Im zweiten Teil wird die Wachstumsverzögerung der Tumore nach gepulster Dosisapplikation verglichen mit jener nach Applikationsdauern im 10–100 Millisekunden Bereich.

4.1 Maus– und Tumormodell

Alle hier durchgeführten Versuche an Mäusen sind von der zuständigen Behörde unter der Projektlizenz 55.2–1–54–1531–37–09 genehmigt.

Als Tumormodell dienen zwei menschliche Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen aus dem Mund und Rachenraum. Als schnell wachsende Linie wurde die FaDu–Linie gewählt, welche 1968 von einem 56–jährigen Hindu in Kalkutta isoliert wurde [Ran72], als langsam wachsende Linie die erst 1998 von einem 51–jährigen Mann kultivierte XF354–Linie [CLS, Küb01].

Als Wirtssystem dienen 7–10 Wochen alte Nacktmäuse, NMRI „nu/nu“ Mäuse bezogen von Charles River Laboratories (Wilmington, USA). Die Mutation „nude“ dieser Mäuse äußert sich zum einen in der namensgebenden Unbehaartheit und erleichtert die Tumorumplantation, –vermessung und –bestrahlung. Vor allem aber besitzen diese Mäuse aufgrund dieser Mutation keinen Thymus [Pan68] und somit keine T–Lymphozyten, wodurch große Teile des Immunsystems fehlen. Damit auch das restliche Immunsystem der Mäuse, vor allem natürliche Killerzellen die humanen Tumore nicht abstößt, wird dies durch eine 4 Gy Ganzkörperbestrahlung mit 200 kV Röntgenstrahlung (RS225, Gulmay Medical, Surrey, Großbritannien) nahezu ausgeschaltet.

Drei Tage später werden etwa 1 mm^3 große Tumorstücke in den linken Hinterlauf der Tiere implantiert. Mittels Ultraschall wird jeden zweiten Tag die Länge, Breite und Tiefe des Tumors bestimmt und hieraus unter der Annahme einer ellipsoiden Form das Volumen berechnet.

Für die Tumorbestrahlungen wurde eine Protonenenergie von 23 MeV gewählt, um stabile Strahlverhältnisse während der 13 Tage dauernden Strahlzeit zu gewährleisten. Damit stand eine Protonenreichweite in Wasser von etwa 5 mm zur Verfügung. Die maximale Tumortiefe zum Bestrahlungszeitpunkt wurde auf 4 mm limitiert um mit großer Sicherheit alle Tumorzellen zu bestrahlen. Die laterale Ausdehnung liegt in diesem Fall bei etwa 7 mm. Diese Größe erreichen die Tumore etwa zwei Wochen nach Implantation.

Die Präparation und Beobachtung der Mäuse wurde in der Arbeitsgruppe um Thomas Schmid, vor allem von Olga Zlobinskaya, durchgeführt.

4.2 Bestrahlungsmethodik

Da laserbeschleunigte Protonen aktuell noch nicht mit hinreichender Energie und vor allem der notwendigen Zuverlässigkeit für Experimente im Tiermodell zur Verfügung stehen, wurde für dieses Projekt bestehende Beschleunigertechnologie verwendet. Durch Pulsung des Protonenstrahls auf eine Nanosekunde wird die charakteristische und prinzipbedingte Zeitstruktur lasergetriebener Ionenstrahlen nachmodelliert. Die Wechselwirkung des Laserpulses mit dem Target findet zwar auf einer Femtosekunden Zeitskala statt, für die Zeitstruktur am Target des hierbei generierten Protonenpuls sind jedoch die Energiebreite sowie der Abstand zum Target entscheidend. Für 100 MeV Protonen beträgt die Laufzeitdifferenz etwa 35 ps pro Meter und Prozent Energieunterschied. Eine Zeitstruktur von einer Nanosekunde entspricht somit einer Energiebreite des lasergetriebenen Strahls von 10 % nach einer Weglänge von 3 m. Laufwegunterschiede bei einer nicht-isochronen Strahlführung können den Puls eventuell weiter verbreitern. Auch wenn die Strahlparameter bei einer möglichen Anwendung derzeit nicht absehbar sind, scheint die hier erreichte und verwendete Zeitstruktur geeignet um Dosisleistungseffekte zu studieren, wie sie für laserbasierte Bestrahlungssysteme zu erwarten sind.

Auf methodischer Seite besteht die Herausforderung dieses Projekts zum einen in der Präparation zweier Protonenstrahlkonfigurationen, womit die Dosis innerhalb einer Nanosekunde bzw. 100 Millisekunden deponiert wird (vgl. 4.2.1 und 4.2.2). Dabei ist die Dosis zuverlässig und möglichst homogen im Tumor zu deponieren ohne die wesentlichen Strahlparameter zu zerstören (4.2.3, 4.2.4). Da bei einer Dosisapplikation auf Nanosekundenskala eine aktive Dosiskontrolle prinzipbedingt nicht möglich ist,

waren Verfahren zu entwickeln die Bestrahlung zumindest retrospektiv zu verifizieren (4.2.5).

Die Strahlpräparation ist bereits in [Dol09, Gre11], der Aufbau in [Gre11] publiziert.

4.2.1 Präparation eines Nanosekunden gepulsten Protonenstrahls zur Tumorbestrahlung

Die Präparation von Nanosekunden langen Protonenpulsen mit hinreichender Fluenz, um mit einem Puls bis zu 20 Gy im Bragg Peak vom 23 MeV Protonen zu deponieren, wird durch die Kombination aus brillanter Protonenquelle, Pulsungssystem und kurzbrennweitiger Ionenlinse von SNAKE am Münchener Tandembeschleuniger möglich.

Die Strahlpräparation ist schematisch in Abb.4.1 dargestellt. Die ECR-Quelle

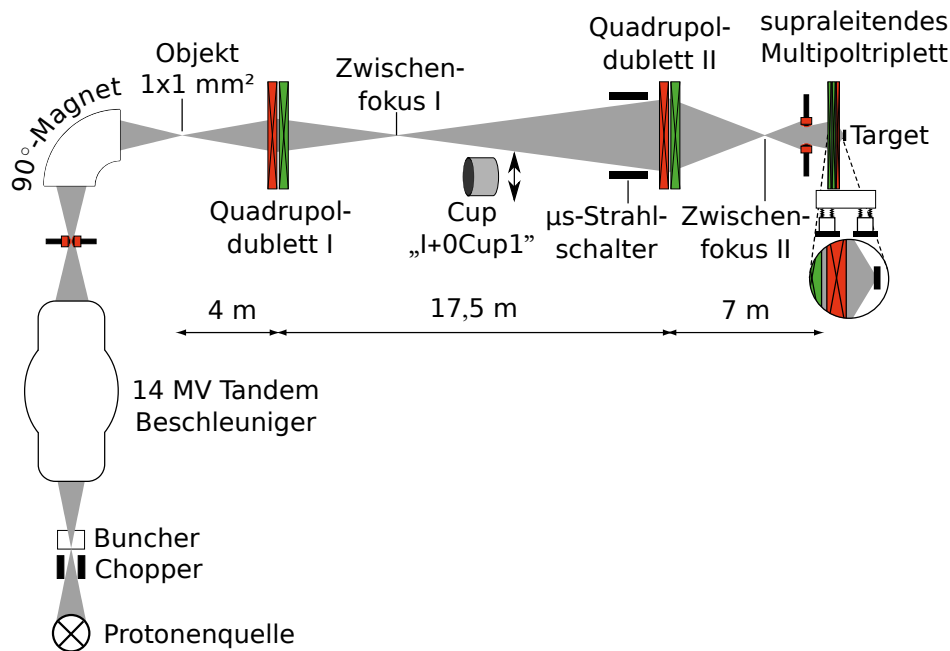


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Strahlpräparation des gepulsten Protonenmikrostrahls. Das Pulsungssystem auf der Niederenergieseite des Tandems, bestehend aus Buncher und Chopper, fokussiert den kontinuierlichen Strahl der Protonenquelle zeitlich auf etwa eine Nanosekunde auf das Target. Die beiden Quadrupoldubletts transportieren einen Großteil des gepulsten Strahls bis wenige Meter vor das Experiment. Das kurzbrennweitige Multipoltripllett fokussiert durch die große Akzeptanz etwa 30–50 % des Strahls auf einen Durchmesser von etwa 100 μm . Der μs -Strahlschalter zwischen den beiden Quadrupoldubletts dient zur Präparation von einzelnen Strahlpulsen aus dem repetierenden, gepulsten Strahl, der Cup „I+0Cup1“ wird zur Messung und Kontrolle des Strahlstroms während der Tumorbestrahlung verwendet.

[Her05] liefert nach Umladung im Cäsiumgas einen kontinuierlichen Strahl negativ geladener Wasserstoffionen, welcher elektrostatisch auf 119 keV vorbeschleunigt wird. Zur Präparation von Nanosekunden langen Pulsen wird das installierte und mit 5 MHz Grundfrequenz betriebene Pulsungssystem [Roh84] verwendet. Der Chopper auf der Niederenergieseite des Tandems schneidet aus dem kontinuierlichen Strahl einzelne Pakete von 70 ns Länge heraus, wobei die Frequenz, f_{rep} , dieser Pakete, nach Bedarf, in Potenzen, n , von 2 reduziert werden kann, $f_{rep} = 5 \text{ MHz}/2^n$. Der Buncher, betrieben mit einer 5 MHz Sinusspannung bei einer Amplitude von bis zu 3,5 kV, fokussiert die Strahlpakete in der Zeit, so dass diese am Targetort eine Breite von nur noch einer Nanosekunde besitzen.

Im Gegensatz zur Mikrostrahlpräparation an SNAKE (vgl. 3.1) ist das Ziel in diesem Falle nicht ein möglichst kleiner lateraler Fokus, sondern mit einem Puls eine möglichst große Fluenz zu applizieren, also das Verhältnis aus Teilchenzahl pro Puls und Strahlfleckgröße zu optimieren. Um im Bragg Peak von 23 MeV Protonen eine Dosis von 20 Gy zu deponieren sind etwa 10^9 Protonen pro Quadratzentimeter nötig (vgl. 4.2.4.1). Für die Präparation wird der Stahl nach dem 90°-Magnet auf einen Durchmesser von 1 mm beschnitten. Dieses Objekt wird mittels konventioneller Quadrupoldoublets zweimal ohne nennenswerte Verkleinerung abgebildet und so verlustfrei bis zum zweiten Zwischenfokus transportiert. Das kurzbrennweitige, supraleitende Multipoltripplett von SNAKE fokussiert den gepulsten Strahl auf eine Größe von etwa $100 \times 100 \mu\text{m}^2$. Die Kombination aus großer Öffnung und damit großer Akzeptanz und kurzer Brennweite dieser Linse erlaubt es mehr als 30 % des Strahls nach dem 90°-Magnet mit Verkleinerungsfaktoren von etwa 10 in beiden Raumrichtungen abzubilden und somit die Fluenz, welche mit einem einzelnen Puls appliziert werden kann, um den Faktor 30 zu steigern.

Die Präparation einzelner Protonenpulse aus diesem gepulsten Strahl geschieht in ähnlicher Weise wie die Einzelionenpräparation im Mikrostrahlmodus an SNAKE (vgl. 3.3). Auf ein Triggersignal hin öffnet der schnelle Strahlschalter solange, bis der nächste Protonenpuls diesen passiert hat. Das Triggersignal für die Passage des Strahlpulses wird aus dem Ansteuersignal des Niederenergiechoppers durch Kompensation der Laufzeitunterschiede des elektrischen Signals und der Ionen generiert. Hierdurch kann auf eine aufwendige Detektion der Strahlpulse vor dem Target verzichtet werden.

Die Auftrefforte der einzelnen Pulse auf dem Target werden in X-Richtung mit einer elektrischen und in Y-Richtung mit einer magnetischen Ablenkeinheit festgelegt. Die Protonenpakete werden in einem rechteckigen Raster nebeneinander gesetzt, so dass in guter Näherung ein homogen bestrahltes Feld von $2 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ Größe entsteht. Ziel ist es die Abstände möglichst groß zu wählen, damit an jedem Punkt möglichst wenig Pulse zur Gesamtdosis beitragen, Lücken zwischen den einzelnen Pulsen sind natürlich

zu vermeiden. Um den gesamten Tumor, welcher zum Bestrahlungszeitpunkt bis zu 7 mm im Durchmesser misst, sicher zu bestrahlen, wird die Maus samt Tumor bewegt und mit 20 solcher $2\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ Felder ein Kreis von 9 mm Durchmesser abgedeckt (vgl. 4.2.3).

Zur Justierung und Kontrolle sowohl der lateralen Pulsabstände, als auch des mechanischen Verfahrens des Tumors werden Radiochrom-Filme (vgl. 4.2.5) verwendet, welche sich bei Bestrahlung lokal verdunkeln. Abb. 4.2a zeigt einen solchen Film, welcher mit einzelnen Protonenpulsen in Abständen von $84\text{ }\mu\text{m}$ in X-Richtung und $143\text{ }\mu\text{m}$ in Y-Richtung, wie sie auch zur Tumorbestrahlung verwendet wurden, bestrahlt wurde.

Um den Tumor mit definierter Dosis zu bestrahlen ist die applizierte Protonenfluenz, F , gemäß der Dosisplanung (vgl. 4.2.4) einzustellen. Die Fluenz ergibt sich als

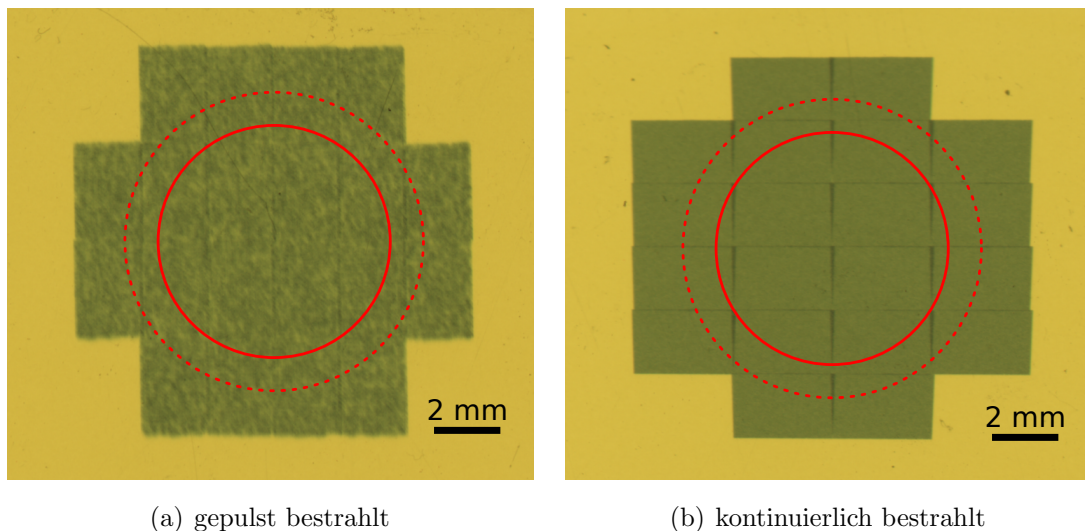


Abbildung 4.2: *Gafchrom Film, welcher sich abhängig der darin deponierten Dosis verdunkelt und hier zur Visualisierung der Bestrahlungsfelder dient. Der Film wurde mit 20 Feldern von $2\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ bzw. $3\text{ mm} \times 2\text{ mm}$ Größe bestrahlt, wobei zum Nebeneinandersetzen der gesamte Bestrahlungsaufbau mit Film mechanisch verfahren wurde. Die Bestrahlungsfluenz betrug 10^9 cm^{-2} . Die gestrichelte rote Linie markiert das runde Zielvolumen mit 9 mm Durchmesser, die durchgezogene Linie den maximalen Tumordurchmesser von 7 mm.*

Im gepulsten Modus (links) bestehen die $2\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ Felder aus jeweils 504 einzeln applizierten Protonenpulsen, welche mittels elektrischer und magnetischer Ablenkeinheit im Abstand von $84\text{ }\mu\text{m}$ in X-Richtung und $143\text{ }\mu\text{m}$ in Y-Richtung nebeneinander gesetzt wurden.

Im kontinuierlichen Modus (rechts) wurde der Strahl mittels Schlitten wenige Meter vor dem Target auf $3\text{ mm} \times 2\text{ mm}$ beschnitten. Der zu erkennende keilförmige Überlapp zwischen den einzelnen Feldern ist durch die nicht perfekt parallelen Kanten der verwendeten Schlitzte bedingt. Der Flächenanteil des Überlapps beträgt etwa 2 %.

Verhältnis der Anzahl der Protonen pro Puls, N , und der Fläche, $\Delta x \Delta y$, zu:

$$F = \frac{N}{\Delta x \Delta y} \quad (4.1)$$

wobei Δx und Δy die Abstände der einzelnen Protonenpulse in X- und Y-Richtung bezeichnen. Die Teilchenzahl pro Puls, N , wird durch Messung des elektrischen Strahlstroms, I , bei bekannter Pulsrepetitionsrate, f_{rep} bestimmt:

$$N = \frac{I/e}{f_{rep}} \quad (4.2)$$

e bezeichnet die Elementarladung. Zum Einstellen der Sollfluenz wird die Teilchenzahl pro Puls, N , durch Variation der Strahlemittanz auf der Niederenergieseite des Tandembeschleunigers angepasst. Da keine Auswirkungen dieser Emittanzänderung auf die Strahlfleckgröße am Target beobachtet wurde, konnten unabhängig von der Sollfluenz dieselben lateralen Abstände der Protonenpulse, Δx und Δy , verwendet werden.

Zur Vermessung der Zeitstruktur des gepulsten Strahls wird mittels einer 0,1 mm dicken Aluminiumfolie als Streutarget vereinzelt Protonen aus den Pulsen in einen schnellen Detektor gestreut. Die Dicke des Streutargets und der Streuwinkel ist so gewählt, dass die Wahrscheinlichkeit zwei Protonen aus demselben Puls in den Detektor zu streuen zu vernachlässigen ist. Mit einem Plastiksintillator mit Photomultiplierauslese als Detektor werden die Ankunftszeiten der gestreuten Protonen relativ

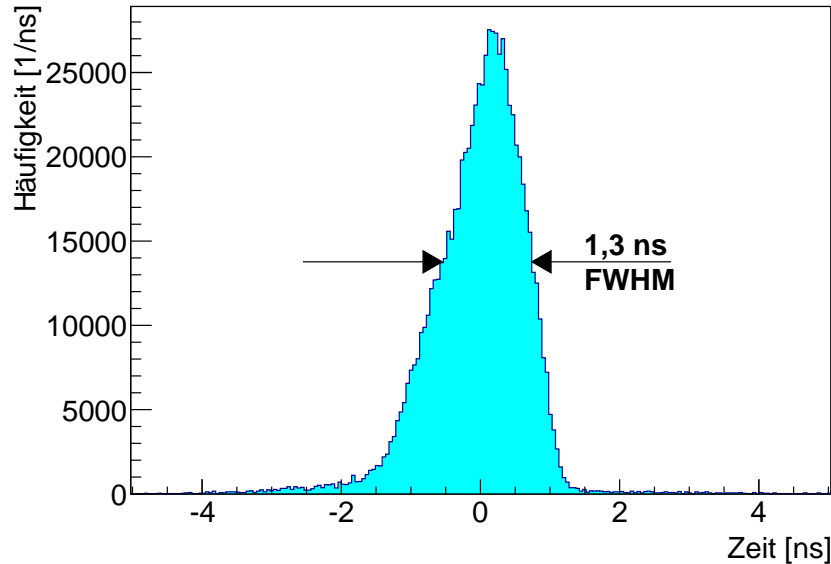


Abbildung 4.3: Zeitstruktur des gepulsten Protonenmikrostrahls während der Tumorbestrahlungen, gemessen durch die Ankunftszeiten einzelner Protonen, welche mittels eines dünnen Streutargets aus den Pulsen in einen Detektor gestreut wurden, relativ zum 5 MHz Signal des Pulsungssystems. Die volle Halbwertsbreite der Zeitstruktur der Pulse lag bei 1,3 ns.

zum 5 MHz–Taktsignal des Pulsungssystems bestimmt. Abb. 4.3 zeigt das Histogramm der Ankunftszeiten, welche die Zeitstruktur der Protonenpulse widerspiegelt. In der Strahlzeit der Tumorbestrahlungen betrug die volle Halbwertsbreite der Protonenpulse 1,3 ns.

4.2.2 Präparation eines Protonenstrahls zur kontinuierlichen Dosisapplikation

Die Vergleichsexperimente mit kontinuierlicher Dosisapplikation wurden am selben Aufbau an SNAKE durchgeführt. Jedoch unterscheiden sich die Anforderungen an den kontinuierlichen Protonenstrahl deutlich, da die Dosis nicht in Nanosekunden, sondern während einer Zeitdauer von 10–100 Millisekunden appliziert werden soll. Die Strahlpräparation erfolgt ohne Chopper und Buncher des Pulsungssystems. Nach dem 90°–Magnet verläuft der kontinuierliche Strahl ohne fokussierende Elemente divergent bis zum Target. Nach sukzessiver Reduktion der Divergenz wird letztendlich mit zwei Schlitzpaaren etwa zwei Meter vor dem Target ein homogen ausgeleuchtetes rechteckiges Feld von 3 mm × 2 mm Größe herauspräpariert. Der Strom wird auf etwa 100 pA reduziert. Die Applikation einer Fluenz von 10^9 cm^{-2} , womit im Braggpeak von 23 MeV eine Dosis von 20 Gy deponiert wird (vgl. 4.2.4.1), dauert somit etwa 100 ms und liegt in der Größenordnung der Bestrahlungszeiten pro Voxel bei der Protonentherapie mit herkömmlichen Beschleunigern. Diese 3 mm × 2 mm Felder werden analog zum gepulsten Modus durch mechanisches Verschieben des Targets nebeneinander gesetzt um das runde Zielvolumen mit 9 mm Durchmesser abzudecken (Abb. 4.2b).

4.2.3 Bestrahlungsaufbau

Neben der Präparation zweier Strahlkonfigurationen zur gepulsten, sowie zur kontinuierlichen Dosisapplikation war zur Bestrahlung von Tumoren im Mausmodell ein spezieller Aufbau zu entwickeln, welcher zum einen für die Maus eine möglichst stressfreie Bestrahlung außerhalb des strahlführenden Vakuums, zum anderen eine zuverlässige Dosisapplikation ermöglicht. Abb. 4.4 zeigt die CAD–Zeichnung des Aufbaus und ein Querschnitt entlang der Strahlachse, Abb. 4.5a eine Fotografie.

Die Maus befindet sich während der Bestrahlung in einer mit Luftlöchern versehenen Aluminiumröhre mit 27 mm Innendurchmesser, deren Temperatur auf 36,5 °C geregelt wird. Dies verhindert zuverlässig ein Auskühlen der sedierten Maus während der etwa 45-minütigen Bestrahlungsprozedur. Der linke Hinterlauf der Maus wird mittels medizinischem Klebeband auf einer an der Röhre angebrachten Aluminiumplatte fixiert, so dass der Tumor mittig in einem 13,5 mm Durchmesser messenden Loch

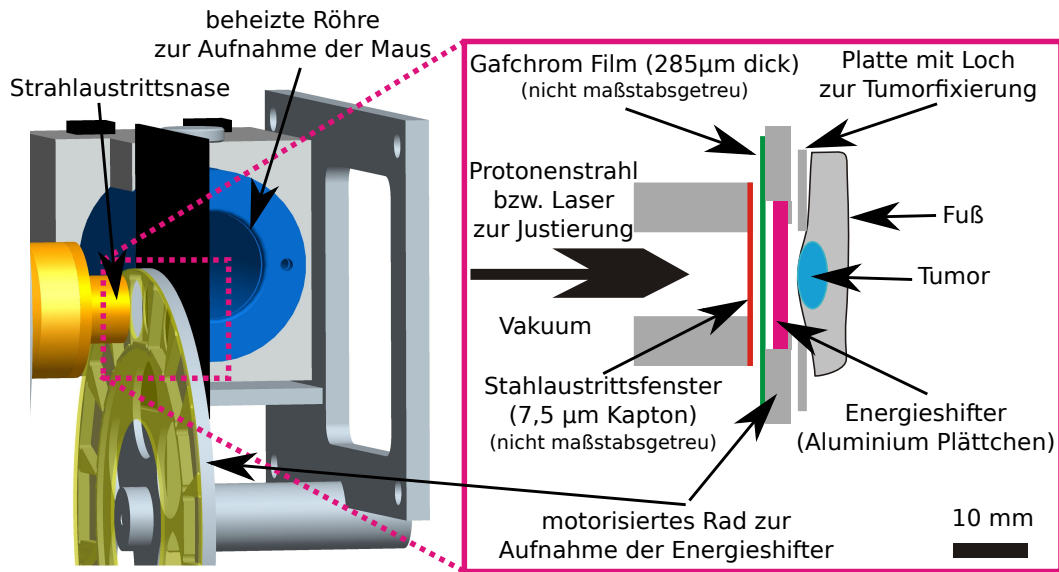
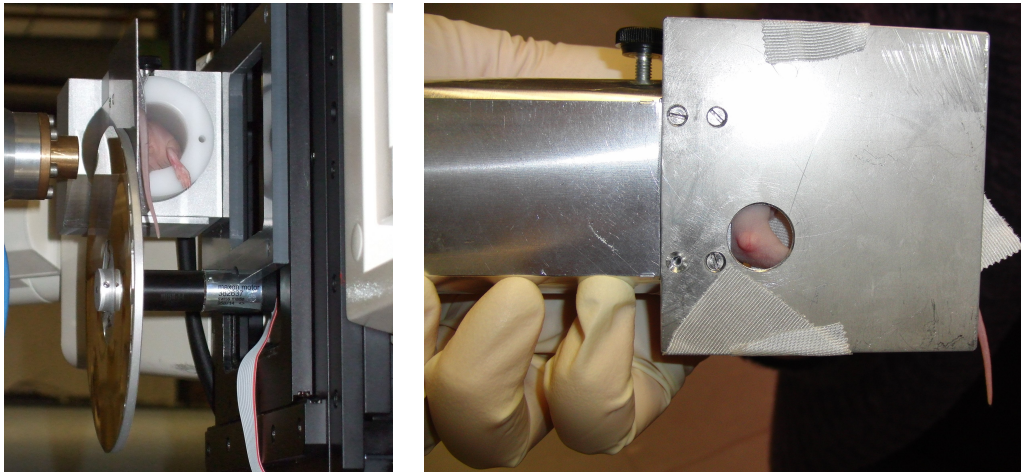


Abbildung 4.4: Links ist eine CAD-Zeichnung des Aufbaus zur Tumorbestrahlung im Mausmodell dargestellt, rechts ein Schnitt entlang der Strahlachse durch diesen. Der Protonenstrahl verlässt das Vakuum an der Strahlaustrittsnase durch eine 7,5 µm dicke Kaptonfolie. Einen Millimeter dahinter ist der Gafchrom Film zur Bestrahlungsverifikation auf dem sogenannten Abschwächerrad befestigt. Im Abschwächerrad sind verschieden dicke Stapel von Aluminiumplättchen montiert, womit die Reichweite der Protonen zum Zusammensetzen des Spread Out Bragg Peaks variiert wird. Die narkotisierte Maus liegt in der blau dargestellten beheizten Röhre und der linke Hinterlauf mit dem Tumor wird mittels Klebeband auf der schwarz dargestellten Aluminiumplatte fixiert. Der Tumor sitzt somit nur einen Millimeter hinter dem Abschwächerrad, was die Aufstreuung des Strahls reduziert. Der komplette Aufbau ist auf einem senkrecht zur Strahlachse verfahrbaren Tisch montiert um durch Verschieben des ganzen Aufbaus inklusive Tumor das runde Zielvolumen mit 9 mm Durchmesser mit den gescannten 2 mm × 3 mm Bestrahlungsfeldern abzudecken.

sitzt, durch welches die Bestrahlung erfolgt (vgl. Abb. 4.5b). Der komplette Aufbau ist an einem senkrecht zur Strahlrichtung verfahrbaren Tisch montiert, welcher computergesteuert, mit einer Genauigkeit unter 3 µm positioniert werden kann. Dieser ermöglicht durch präzise mechanische Bewegung des Targets die Zusammensetzung der 2 mm × 3 mm großen Bestrahlungsfelder zu einer Gesamtfläche von 1,2 cm².

Der Protonenstrahl wird im Vakuum bis zur Strahlaustrittsnase wenige Millimeter vor dem Tumor transportiert, wo die Protonen durch eine 7,5 µm dicke Kaptonfolie das Vakuum verlassen. Einen Millimeter dahinter ist das sogenannte Abschwächerrad montiert, welches zum einen den Gafchromfilm haltet, durch dessen Verdunkelung die applizierte Fluenz der Bestrahlung rekonstruiert wird (vgl. 4.2.5). Zum anderen sind in den Aussparungen der 16 Positionen des Abschwächerrades Stapel von Aluminiumplättchen mit einer Gesamtdicke zwischen 0 bis 2,8 mm in 0,2 mm Abstufungen



(a) Bestrahlungsaufbau

(b) Maushalter mit Maus und Tumor

Abbildung 4.5: Links: Fotografie des in Abb. 4.4 schematisch dargestellten Bestrahlungsaufbaus mit Abschwächerrad, beheizten Maushalter sowie fixierter und narkotisierter Maus. Zur Bestrahlung wird der Aufbau einen Millimeter vor der links zu erkennenden Austrittsnase positioniert.

Rechts: Fotografie des Maushalters aus Sicht des Strahls. Der linke Hinterlauf der Maus ist auf der Metallplatte fixiert. Hierdurch wird der Tumor zuverlässig in dem Loch, wodurch die Bestrahlung erfolgt, zentriert.

einggebracht. Hiermit wird die Energie und damit die Reichweite der Protonen im Tumor je nach gewählter Position der Rades variiert. Diese ermöglicht durch das Konzept des Spread Out Bragg Peaks (siehe 2.1.1) eine annähernd homogene Tiefendosisverteilung im Tumor (vgl. 4.2.4.1).

Zur Positionierung der Maus und des Tumors kann der gesamte Aufbau in Strahlrichtung verschoben werden. Im Zusammenspiel mit einem Loch im Abschwächerrad und dem Gafchromfilm ist der Tumor aus Strahlrichtung gut sichtbar. Eine im Vakuum auf einen 4-Achsenmanipulator montierte und zum Strahl justierbare Laserdiode erlaubt so die präzise Positionierung der gut sichtbaren subkutanen Tumore zum Strahl.

4.2.4 Dosisplanung

Für die Dosisplanung wurde ein für alle Tumore einheitliches zylinderförmiges Zielvolumen von 5 mm Tiefe und 9 mm Durchmesser definiert, welches homogen mit einer mittleren Dosis von 20 Gy zu bestrahlen ist. Die Tiefe von 5 mm ist bedingt durch die maximal zur Verfügung stehende Protonenenergie von 23 MeV und entspricht der Reichweite der Protonen nach der Austrittsfolie und dem Gafchromfilm. Die maximale Tiefe der zu bestrahlenden Tumore wurde auf 4 mm limitiert, größere Tumore wurden

Schicht, n	Fluenz, F [10^9 cm^{-2}]
1	1,044
2	0,456
3-4	0,306
5-8	0,197
9-13	0,140

Tabelle 4.1: *Fluenzen der 13 Schichten des Spread Out Bragg Peaks. $n = 1$ bezeichnet die Schicht am hinteren Ende des Zielvolumens, welche mit der höchsten Energie und Fluenz bestrahlt wird, $n = 13$ die vorderste Schicht.*

nicht bestrahlt. Die typische laterale Ausdehnung von XF354 bzw. FaDu Tumoren mit 4 mm Tiefe implantiert im Hinterlauf der Tiere liegt bei etwa 7 mm, was das zweite Eingangskriterium darstellt. Die gewählte Kombination aus Zielvolumen und Eingangskriterium lässt sowohl in der Tiefe, als auch lateral einen Sicherheitsspielraum von einem Millimeter.

Für die Dosisplanung waren zwei konträre Zielsetzungen maßgeblich. Zum einen soll die Dosisverteilung möglichst homogen sein, zum anderen soll die Wirkung gepulster Dosisapplikation untersucht werden, wofür es notwendig ist, an jedem Punkt im Zielvolumen einen möglichst großen Anteil der Gesamtdosis in möglichst wenigen Pulsen zu applizieren. Mit zunehmendem Überlapp der in erster Näherung gaußförmigen Pulse wird auch die Dosisverteilung homogener. Andererseits muss hierfür bei gleichbleibender mittlerer Dosis die Teilchenzahl pro Puls reduziert werden, womit auch die pro Puls deponierte Dosis reduziert wird. Die Gesamtdosis muss so durch eine größere Anzahl von Einzelpulsen deponiert werden.

4.2.4.1 Axiale Dosisplanung

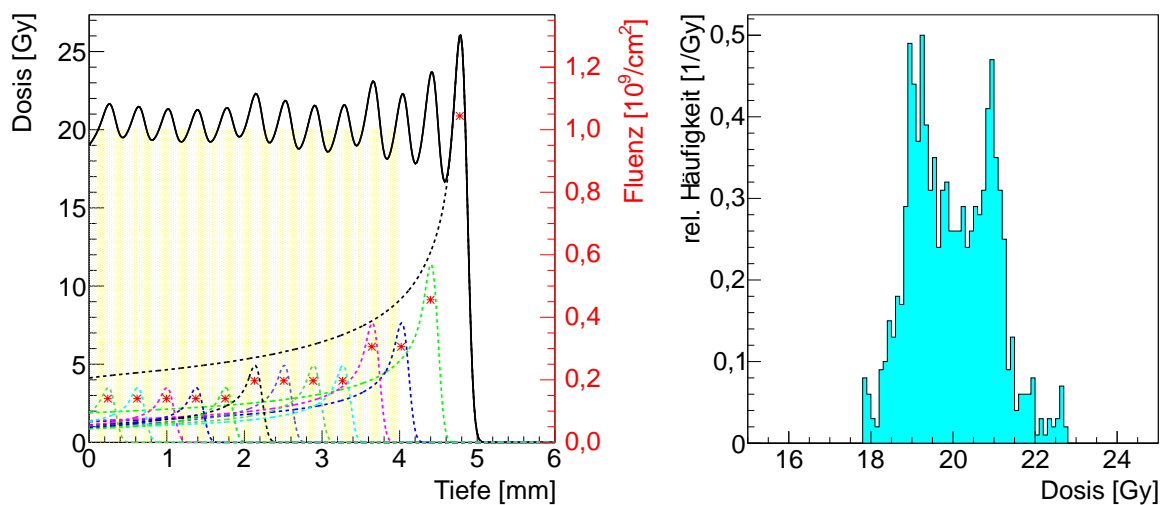
Die Optimierung der im folgenden dargestellten, axialen Dosisplanung wurde in der Arbeitsgruppe von Jan J. Wilkens am Klinikum Rechts der Isar durchgeführt.

Die homogene Dosisverteilung in axialer Richtung wird mittels des Spread Out Bragg Peak Konzepts (vgl. 2.1.1) realisiert. Abb. 4.6a zeigt die verwendete Tiefendosisplanung, welche aus Braggpeaks 13 verschiedener Energien mit nur fünf verschiedenen Fluenzen und damit Protonenzahlen pro Puls zusammengesetzt ist. Die Fluenzen sind in Tab. 4.1 aufgelistet. Die verschiedenen Energien der Einzelkomponenten werden durch Energieverlust der Protonen in Aluminiumplättchen der Dicke $(n - 1) \cdot 0,2 \text{ mm}$ im Abschwächerrad generiert, wobei $n = 1$ die hinterste Schicht und $n = 13$ die vorderste Schicht des Spread Out Bragg Peaks bezeichnet. Die Limitierung der Anzahl

verwendeter Fluenzen reduziert die Komplexität und damit den Zeitbedarf und die Fehleranfälligkeit des Bestrahlungsablaufs (vgl. 4.2.6). Vor allem aber wird durch die nur 13 Lagen der Überlapp der verschiedenen Braggpeaks klein gehalten und so verhindert, dass die Dosisbeiträge der einzelnen Pulse zu klein werden. Im Gegenzug sind jedoch noch deutliche Oszillationen der Dosis mit der Tiefe zu erkennen. Abb. 4.6b zeigt das Histogramm der Dosiswerte bis 4 mm Tiefe, der maximalen Tumortiefe. Die Oszillationen resultieren in einer bimodalen Verteilung mit Maxima bei 19 Gy und 21 Gy und einer Standardabweichung von 1,0 Gy.

4.2.4.2 Laterale Dosisplanung

Im gepulsten Modus werden die fokussierten Protonenpulse lateral mit einem Abstand von 84 μm in X-Richtung und 143 μm in Y-Richtung appliziert. Abb. 4.2 zeigt einen so bestrahlten Gafchrom Film, welcher direkt hinter der Strahlaustrittsnase angebracht war. Vergrößert man die Pulsabstände, so bilden sich deutlich Minima zwischen den einzelnen Pulsen aus. Rückt man die Abstände enger zusammen, so wird die Homo-



(a) Tiefendosisverteilung des Spread Out Bragg Peaks

(b) Histogramm der Tiefendosis

Abbildung 4.6: Links: Tiefendosisverteilung des Spread Out Bragg Peaks. Die durchgezogene Linie zeigt die Gesamtdosis als Summe der 13 einzelnen Braggpeaks, die gepunkteten Linien die einzelnen Beiträge der verschiedenen Energien bei nur fünf verschiedenen Fluenzen, welche durch die roten Sternchen dargestellt sind (rechte Skala). Die gelbe Fläche kennzeichnet in X-Richtung die maximale Tiefe der Tumoren und den Tiefenbereich für das Dosishistogramm rechts, in Y-Richtung die Solldosis von 20 Gy.

Rechts: Histogramm der links dargestellten Tiefendosisverteilung im Bereich bis 4 mm, was der maximal akzeptierten Tumortiefe entspricht. Aufgrund der Oszillation der Dosis mit der Tiefe zeigt die Verteilung zwei Maxima bei etwa 19 und 21 Gy. Die mittlere Dosis beträgt 20 Gy, die Standardabweichung 1,0 Gy.

genität nicht signifikant besser, jedoch verringert sich, durch den größeren Überlapp der Einzelpulse, die pro Puls applizierte Dosis. Für die Optimierung der Pulsabstände war die Strahlbreite direkt nach der Austrittsnase maßgeblich, wo diese durch die ionenoptische Abbildung bestimmt ist. Durch Kleinwinkelstreuung in Materie werden die Strahlpulse bis zu ihrer maximalen Reichweite im Tumor aufgeweitet, was nicht nur die Homogenität im Tumor zusätzlich erhöht, sondern auch die Anzahl der zur Gesamtdosis beitragenden Pulse. Dies könnte bei der Optimierung der Abstände berücksichtigt werden um die notwendige Anzahl der Pulse zur Dosisdeposition weiter zu reduzieren. Aufgrund der schwierigen Diagnostik und der damit verbundenen Gefahr eine inhomogenen Dosisverteilung sowie der zusätzlichen Komplexität der Bestrahlung wurde hierauf verzichtet.

Im kontinuierlichen Modus wird das Bestrahlungsfeld aus den homogenen $3\text{ mm} \times 2\text{ mm}$ Felder zusammengesetzt. Bei dieser Feldgröße ist die Strahlaufweitung durch Kleinwinkelstreuung zu vernachlässigen.

4.2.4.3 Analyse der Dosisplanung

Wie oben diskutiert stellt die Dosisplanung einen Kompromiss zwischen möglichst homogener Bestrahlung des Tumors und einer möglichst geringen Anzahl von Pulsen und damit einer möglichst hohen Dosisleistung dar. Im Folgenden soll abgeschätzt werden, wie viele Pulse wesentlich zur Gesamtdosis beitragen, beziehungsweise wie groß der größte Beitrag eines Pulses ist. Dies wird durch die Aufstreuung des Strahls mit zunehmender Tiefe bei Durchgang durch Materie, hier im Gafchrom Film, den Aluminiumplättchen zur Reichweitenvariation und dem Tumor selbst, erschwert. Zur Vereinfachung wird angenommen, dass die gaußförmigen Einzelpulse mit einer Breite von $\sigma = 50\text{ }\mu\text{m}$ in beiden Raumrichtungen im Abstand von $100\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ nebeneinander appliziert werden. Eine einfache numerische Rechnung zeigt, dass mit einem Abstand von 2σ , also der doppelten Pulsbreite, die Dosis sehr homogen appliziert werden kann. Die Standardabweichung der Verteilung der Dosiswerte beträgt in diesem Falle nur 1,4%, die maximal Abweichung vom Mittelwert etwa 3%. Vergrößert man die Abstände auf 3σ , so beträgt die Standardabweichung schon 22,5% und die Dosen variieren zwischen 60,4% und 149,8% der mittleren Dosis. Obwohl eine direkte Messung der Pulsgröße aufgrund des Aufwandes nicht durchgeführt wurde, scheint die Größenordnung der Annahme plausibel.

Weitere Eingangsparameter sind die Aufstreuungen der Strahlpulse verschiedener Energie in Abhängigkeit der Tiefe bei der in 4.2.3 beschriebenen Geometrie. Hierzu wurde die Aufstreuung der Protonen in der Austrittsnase, dem Gafchrom Film, den Aluminiumplättchen und dem Tumor selbst für die verschiedenen Energien und Schichten mit TRIM [Zie] simuliert und quadratisch zur Anfangsbreite von $\sigma = 50\text{ }\mu\text{m}$ addiert.

Abbildung 4.7 zeigt die resultierenden Strahlbreiten in den verschiedenen Tiefen des Tumors in Abhängigkeit der Reichweite des betrachteten Protonenpulses. Am schmalsten ist die Strahlbreite mit $54\text{ }\mu\text{m}$ für die größte Reichweite, also der größten Energie, in der ersten Schicht des Spread Out Bragg Peaks, da hierbei am wenigsten Materie durchdrungen werden muss. Hingegen ergibt sich für die geringste Reichweite eine Strahlpulsbreite, welche mit $154\text{ }\mu\text{m}$ drei mal so groß wie die anfängliche Strahlbreite ist.

Um numerisch die Anzahl der Pulse zu berechnen, welche zur Deposition von 50 % der Dosis, 10 Gy, nötig sind, wird wiederholt eine Schicht und ein Punkt mit relativer Lage zur $100\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ Bestrahlungsmatrix zufällig und gleichverteilt gewürfelt und für jede Ionenreichweite jeweils die Beiträge aller 400 nächstgelegenen Pulse berechnet, sortiert und die minimal nötige Anzahl von Pulsen zur Applikation von 50 % der Dosis bestimmt.

Abbildung 4.8a zeigt das Ergebnis dieser Simulation. Am Ende des Zielvolumens in 5 mm Tiefe sind sechs Pulse nötig um die Hälfte der Dosis zu deponieren. Nach vorne steigt diese Zahl bis auf etwa 25 an, da hier neben dem lateralen Überlapp der Strahlpulse auch noch der axiale Überlapp der verschiedenen Braggpeaks zum Tragen kommt. Zum Vergleich ist die Größe $N_{50,\text{SOBP}}$ eingezeichnet, welche nur den

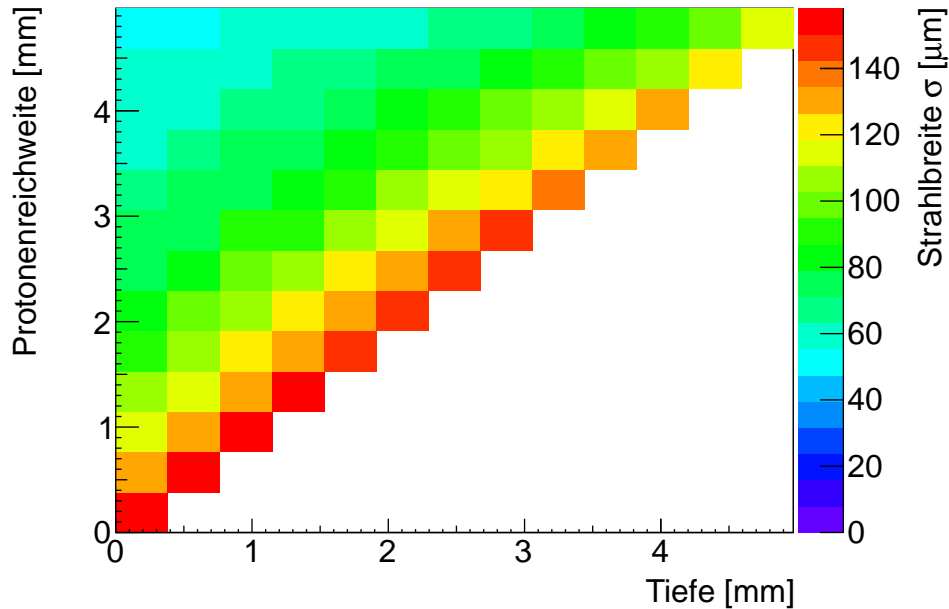
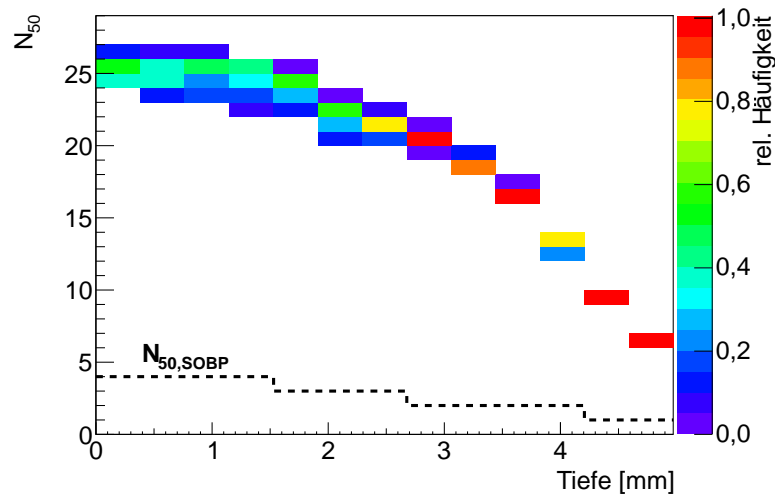
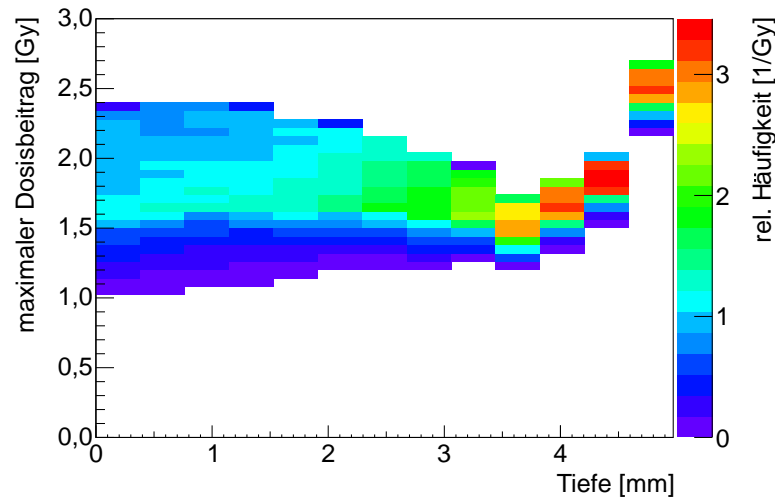


Abbildung 4.7: Das Diagramm zeigt farbkodiert die Breiten, σ , der Strahlpulse in Abhängigkeit ihrer Reichweite (Y-Achse) und der Tiefe im Tumor (X-Achse). Die laterale Aufstreuung wurde mittels TRIM [Zie] in der in Abb. 4.4 dargestellten Geometrie simuliert und quadratisch zur anfänglichen Strahlfleckgröße vom $\sigma = 50\text{ }\mu\text{m}$ addiert.



(a) Anzahl der notwendigen Pulse um 50 % der Dosis zu applizieren.



(b) Maximaler Dosisbeitrag eines Pulses

Abbildung 4.8: Oben: Das Histogramm zeigt die Häufigkeitsverteilung für die Anzahl der Strahlpulse, N_{50} , welche nötig sind um 50 % der Dosis zu applizieren. Diese variiert zwischen sechs Pulsen am hinteren Ende des Zielvolumens in 5 mm Tiefe und steigt nach vorne bis auf etwa 25 an. Die gestrichelte Linie zeigt, wie viele verschiedene Komponenten, $N_{50,SOBP}$, des Spread Out Bragg Peaks beitragen um 50 % der Gesamtdosis zu deponieren. Diese Größe steigt von eins in der hintersten auf vier in der vordersten Schicht an. $N_{50,SOBP}$ stellt den Grenzwert dar, falls die Fluenz jeder Komponente des Spread Out Bragg Peaks auf der kompletten Fläche des Zielvolumens mit nur einem Puls appliziert wird. Für die verwendete Dosisplanung ist N_{50} etwa 6–7 mal größer als nur durch den Spread Out Bragg Peak bedingt. Unten: Aufgetragen ist für jede Tumortiefe farbkodiert die Häufigkeit des größten Dosisbeitrages eines Pulses. An jeder Stelle des Tumors trägt mindestens ein Puls mit mindestens einem Gray zur Gesamtdosis bei, wobei kein Pulsbeitrag größer als 2,7 Gy ist.

Überlapp der Komponenten des Spread Out Bragg Peaks berücksichtigt und annimmt die gesamte Dosis jeder Komponente auf der kompletten Fläche des Zielvolumens in einem einzigen Puls zu deponieren. In diesem Falle steigt $N_{50,SOBP}$ von eins am Ende des Spread Out Bragg Peaks, wo nur eine Teilchenenergie beträgt, bis auf vier am Beginn dessen an und liegt damit etwa einen Faktor 6–7 unter der verwendeten Dosisplanung.

Eine weitere interessante Größe bei der Beurteilung der Dosisplanung ist die Dosis des am meisten zur Gesamtdosis beitragenden Einzelpulses. Die Häufigkeitsverteilung dieser Größe ist in Abb. 4.8b dargestellt. Am Ende des Zielvolumens beträgt der größte Beitrag eines Pulses zwischen 2,1 und 2,7 Gy. An jeder Stelle des Tumor wird mindestens ein Gray mit einem einzigen Puls appliziert.

Für die Untersuchung der Wirkung gepulster Bestrahlung und im Hinblick auf eine mögliche Anwendung gepulster Protonenstrahlen in der Tumorthherapie stellt diese Dosisplanung ein realistisches Modell dar. Höhere pro Nanosekunden Protonenpuls applizierte Dosen sind, soweit man das aktuell einschätzen kann, bei laserbasierten Systemen nicht zu erwarten. Zum einen ist nicht anzunehmen, auch wenn dies technisch möglich sein sollte, dass mehr als 10 % bis 20 % der Fluenz pro Voxel in einem einzigen Puls appliziert wird. Bei einer eventuellen Fehlapplikation wäre ein Ausgleich durch mehr oder weniger Pulse in einem bestimmten Voxel nur noch schwer oder gar nicht mehr möglich. Geht man von den aktuell üblichen Fraktionierungsschemata mit etwa 2 Gy pro Fraktion aus, so bedeutet dies, dass maximal etwa 0,2 Gy bis 0,4 Gy in einem Nanosekunden Puls appliziert wird. Desweiteren ist zu erwarten, dass auch bei Tumorbestrahlungen am Patienten ein Überlapp der Einzelpulse die pro Puls applizierte Dosis reduziert. Allerdings sind die Ergebnisse der hier durchgeführten Analyse der Dosisplanung nicht eins zu eins auf den Patientenfall übertragbar. Aktuelle Arbeiten [Sch10a] schlagen vor, durch Zusammenfassen von Voxeln in lateraler und/oder axialer Richtung die notwendige Anzahl von Einzelpulsen zur Bestrahlung eines Patienten zu reduzieren, um hiermit auch die Anforderung an die Repetitionsraten von laserbasierten Bestrahlungssystemen zu reduzieren. Solche Konzepte würden zwar den Überlapp und die damit verbundene Reduktion der Dosis pro Puls verkleinern, ein Szenario mit vernachlässigbarem Überlapp der Einzelpulse scheint dennoch unrealistisch. Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die pro Einzelpuls applizierten Dosen bei einer möglichen Anwendung der Laserbeschleunigung zur Tumorthherapie vermutlich deutlich kleiner ausfallen werden als in dem hier verwendeten Modellsystem.

4.2.5 Bestrahlungsverifikation

Zur Kontrolle der durchgeführten Tumorbestrahlungen, vor allem der applizierten Fluenzen, wurde von Sabine Reinhardt ein auf Gafchromic® EBT2 Filmen, sogenannten

radiochrom Filmen, basierendes Verifikationskonzept [Rei12a] entwickelt. Die Fluenzbestimmung und Dosisrekonstruktion der in 4.3 beschriebenen Versuchsreihe wurden von Christian Siebenwirth im Rahmen seiner Diplomarbeit [Sie10] durchgeführt.

Radiochrom Filme werden in der Medizin für Dosimetriezwecke, z. B. zur Qualitätssicherung bei Tumorbestrahlungen mit Photonen, verwendet. Diese Filme besitzen eine wenige Mikrometer dicke aktive Schicht, welche bei Bestrahlung eine sogenannte radiochrom Reaktion vollführt, d. h. aufgrund der durch ionisierende Strahlung darin deponierten Energiedosis die Farbe ändert [But03, Dev11]. Bei den verwendeten EBT2 Filmen besteht die aktive Schicht aus einer mikrokristallinen Diacetylen Suspension, welche durch strahleninduzierte Radikale zu Polydiacetylen polymerisiert, welches blau ist [Kir10]. Die Färbung des Films wird mit einem Durchlicht-Flachbettscanner (Epson Perfection V700 Photo) gemessen und hieraus, mittels einer Kalibrierkurve die im Film absorbierte Dosis und somit bei bekanntem LET die applizierte Fluenz bestimmt.

Der Film ist auf der strahlzugewandten Seite des Energieabschwächerrads befestigt (vgl. 4.2.3), wodurch der Film unabhängig der aktuell bestrahlten Schicht des Spread Out Bragg Peaks mit Protonen derselben Energie von 23 MeV bestrahlt wird. Dies vermeidet LET-Abhängigkeiten in der Reaktion des Films, welche vor allem im Bereich des Bragg-Peaks die Dosis deutlich unterschätzen [Kir10] und erleichtert so die Kalibration und Auswertung.

Da der Film auf dem Abschwächerrad befestigt ist, wird dieser sowohl beim mechanischen zusammensetzen der $3\text{ mm} \times 2\text{ mm}$ Felder, als auch beim Drehen des Abschwächerrads mitbewegt. Hierdurch werden die Fluenzen aller 13 Komponenten des Spread Out Bragg Peaks auf einer Filmscheibe festgehalten (Abb. 4.9).

Um aus der Farbänderung auf die absorbierte Dosis und damit die Bestrahlungsfluenz schließen zu können wurde eine Kalibrierkurve mit 20 MeV Protonen aufgenommen. Aufgrund von Problemen mit der Spannungsfestigkeit des Beschleunigers während der Kalibrationsstrahlzeit standen keine 23 MeV Protonen zur Verfügung. Der LET während der Kalibrierung ist zwar um 10 % größer, eine signifikante Unterschätzung der applizierten Dosis ist erst bei Protonenenergien unterhalb von 15 MeV zu erwarten [Rei12b]. Als Referenz für diese Kalibriermessung diente ein Strommessgerät (Keithley 610C, Fa. Keithley Instruments Inc.), womit der elektrische Strahlstrom und bei bekannter Bestrahlungsfeldgröße die Fluenz gemessen wurde. Auf Basis der bestrahlten Filme kann die applizierte Fluenz mit einer statistischen Genauigkeit von 3 % rekonstruiert werden. Die gewonnene Kalibrierkurve [Gre11] stimmt in dem verwendeten Dosis- bzw. Fluenzbereich auf 3 % mit einer unabhängig an einer Protonentherapieanlage gemessenen Kalibrierkurve [Rei12b, Rei12a] derselben Filmcharge überein. Dieser Wert wird als Fehlerabschätzung der Absolutkalibrierung verwendet.

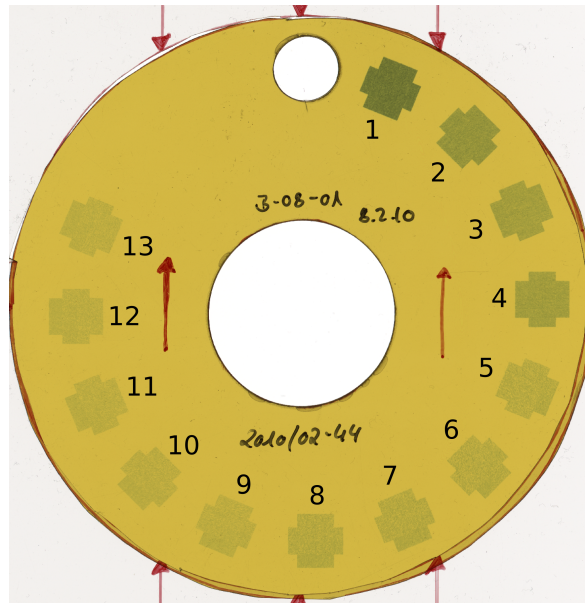


Abbildung 4.9: Bei einer gepulsten Tumorbestrahlung exponierter und geschwärzter Gafchromic® Film, welcher zur Dosisrekonstruktion verwendet wird. Deutlich zu erkennen sind die 13 $12\text{ mm} \times 12\text{ mm}$ großen Felder, welche aus je 20 $3\text{ mm} \times 2\text{ mm}$ Feldern zusammengesetzt sind. Die 13 Felder wurden bei der Bestrahlung der 13 Schichten des Spread Out Bragg Peaks exponiert. Die hinterste Schicht (1) wurde mit der größten Fluenz bestrahlt, was an der stärksten Farbveränderung zu erkennen ist. Bis zu den Schichten 9–13 nimmt die Fluenz um etwa eine Größenordnung ab (vgl. 4.2.4.1 und 4.1).

Die gemessenen Fluenzwerte wurden zum einen mit den Sollfluenzen aus der axialen Dosisplanung verglichen. Zum anderen wurde aus den Fluenzwerten und dem Bragg-Peak-Modell, welches als Grundlage der axialen Dosisplanung dient, für jeden Tumor die Dosis in den verschiedenen Tiefen und hieraus die mittlere Dosis im Zielvolumen rekonstruiert [Sie10].

4.2.6 Bestrahlungsablauf

Die Herausforderung der Bestrahlungsdurchführung im gepulsten Modus besteht darin, dass es nicht möglich ist, die wesentlichen Strahlparameter, vor allem die Teilchenzahl pro Puls und damit die Fluenz sowie die Strahlfleckgröße, während der Bestrahlung zu überwachen. Die Strahlfleckgröße ist durch die Linseneinstellungen zwischen Objekt und Target gegeben und erfahrungsgemäß über eine ganze Strahlzeit von einigen Tagen stabil. Die mittlere Teilchenzahl pro Puls wird über den elektrischen Strahlstrom bei bekannter Pulsrate bestimmt. Der Strahlstrom kann während der Bestrahlung nur etwa 10 m vor dem Tumor im Cup „I+0Cup1“ gemessen werden, nicht allerdings nach der letzten Linse (vgl. Abb. 4.4). Eine Strommessung wenige Zentimeter vor dem Tu-

mor würde zu einer nur schwer abzuschätzenden, zusätzlichen Dosis durch strahlinduzierte Sekundärteilchen, wie Neutronen, führen. Die Transmission zwischen dem Cup „I+0Cup1“ und dem Target beträgt, je nach Strahldivergenz und damit der mittleren Teilchenzahl pro Puls, allerdings nur zwischen 30 % und 50 %. Aus diesem Grund muss vor jeder Bestrahlung für jede der fünf verschiedenen Bestrahlungsfluenzen und den hierfür benötigten Blendeneinstellungen das Verhältnis der Strahlströme im Cup „I+0Cup1“ und dem Target bestimmt werden, um während des Bestrahlungsvorgangs zwischen den einzelnen Schichten des Spread Out Bragg Peaks den Strahlstrom nach zu justieren oder die Bestrahlung abubrechen, falls die Strahlveränderungen nicht mehr akzeptabel sind.

Während dieser Strahleichtung wird die zu bestrahlende Maus narkotisiert und der linke Hinterlauf samt Tumor am Maushalter befestigt. Nach Abschluss der Eichung wird der Halter am Strahlplatz montiert und der Tumor mit Hilfe des Justierlasers positioniert. Der Gafchrom Film wird am Abschwächerrad befestigt und der gesamte Aufbau einen Millimeter vor der Strahlaustrittsnase positioniert. Die Bestrahlung wird Komponente für Komponente des Spread Out Bragg Peaks durchgeführt. Für jede Komponente wird die Reichweite der Protonen im Tumor mittels des Abschwächerrads angepasst und die Teilchenzahl pro Puls und damit die Fluenz gemäß der vorherigen Eichung eingestellt. Die Bestrahlung einer Komponente des Spread Out Bragg Peaks dauert etwa 70 bis 80 Sekunden. Die Bestrahlungszeit des gesamten Tumors beträgt inklusive Anpassen und Kontrolle der Strahlparameter typischerweise 35 min. Nach der Bestrahlung wird die Maus wieder ausgebaut und wacht unter einer Wärmelampe auf. In dieser Zeit wird die vor der Bestrahlung durchgeführte Eichung zwischen Cup „I+0Cup1“ und dem Target nochmals kontrolliert. Der Gesamtvorgang mit Einbau der Maus, Justage, Strahleichtung, Bestrahlung und Kontrolle der Strahleichtung dauert etwa eine Stunde.

Der Bestrahlungsablauf im kontinuierlichen Modus läuft sehr ähnlich ab. Allerdings ist die Strahlpräparation deutlich weniger kritisch, da die Fluenzen für die verschiedenen Komponenten des Spread Out Bragg Peaks einfach durch die Bestrahlungszeit eingestellt werden und somit nur eine Strahlkonfiguration konstant zu halten ist. Hierzu wurde ebenfalls das Verhältnis der Strahlströme zwischen Cup „I+0Cup1“ und dem Target verwendet.

4.3 Durchgeführte Tumorbestrahlungen

Mit dem beschriebenen Aufbau wurden in einer Strahlzeit von 13 Tagen insgesamt 23 Mäuse bestrahlt, 11 mit kontinuierlicher und 12 mit gepulster Dosisapplikation. Abb. 4.10 zeigt das Histogramm der mittels Gafchrom Filmen rekonstruierten, über das Zielvolumen gemittelten Bestrahlungsdosen. In Tab. 4.2 sind die Mittelwerte, sowie die Streuung für die verschiedenen Tumorgruppen aufgeführt. Der Mittelwert bei

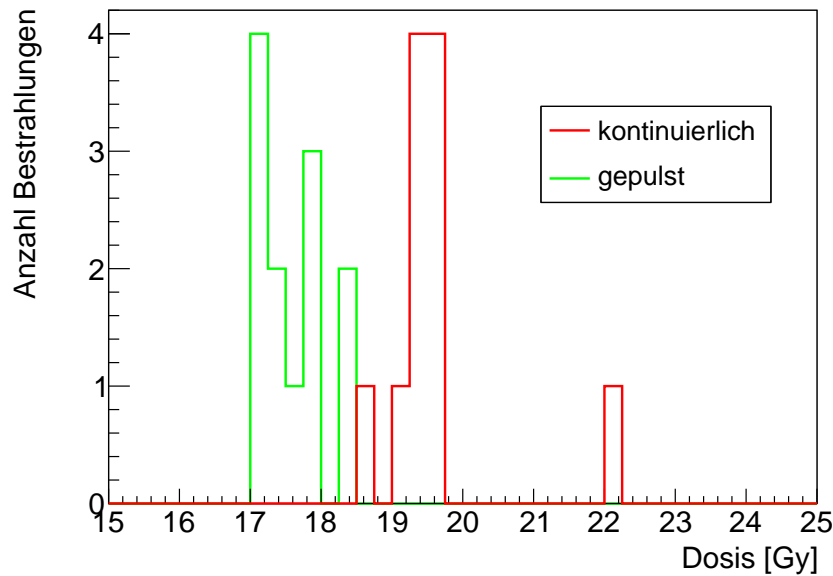


Abbildung 4.10: Histogramm der mittels Gafchromfilmen rekonstruierten und über den Tumor gemittelten Dosiswerten der 11 kontinuierlich und 12 gepulst bestrahlten Tumore. Im kontinuierlichen Modus lag die mittlere rekonstruierte Dosis bei 19,6 Gy bei einer Standardabweichung von 0,9 Gy. Im gepulsten Modus ergab sich ein Mittelwert von 17,6 Gy und eine Standardabweichung von 0,5 Gy.

	kontinuierlich				gepulst			
	n	\bar{D} [Gy]	σ_D [Gy]	$\Delta_{\bar{D}}$ [Gy]	n	\bar{D} [Gy]	σ_D [Gy]	$\Delta_{\bar{D}}$ [Gy]
XF354	5	19,42	0,20	0,83	6	17,85	0,52	1,24
FaDu	6	19,74	1,22	0,97	6	17,41	0,34	1,20
FaDu+XF354	11	19,60	0,89	0,87	12	17,63	0,48	1,22

Tabelle 4.2: Aufgeführt sind die Anzahl bestrahlter Tumore, n , die Mittelwerte der applizierten Dosis, \bar{D} , sowie die Standardabweichung der Dosis, σ_D , und die Gesamtfehler (inklusive systematischen Fehlern), $\Delta_{\bar{D}}$, der mittleren applizierten Dosis im kontinuierlichen bzw. gepulsten Modus aufgeschlüsselt nach den beiden Tumorgruppen sowie für alle Tumore. Die deutlich größere Streuung bei der Bestrahlung der FaDu-Tumore im kontinuierlichen Modus ist auf einen Ausreißer zurückzuführen, welcher aufgrund menschlichen Versagens mit 22 Gy bestrahlt wurde.

kontinuierlicher Applikation lag bei 19,6 Gy die Standardabweichung betrug 0,9 Gy oder 4,3 %. Vernachlässigt man den Ausreißer bei etwa 22 Gy, der auf menschliches Versagen bei der Kalibrierung des Strahlstroms zurückzuführen ist, so lag die Streuung bei nur 1,5 %. Im gepulsten Modus lag der Dosismittelwert bei 17,6 Gy, die Breite der Verteilung bei 0,5 Gy bzw. 2,6 %.

Berücksichtigt man, dass während der Bestrahlungsdauer von etwa einer halben Stunde die wesentlichen Strahlparameter, wie in 4.2.6 diskutiert, nur indirekt kontrolliert werden können, zeigt diese Auswertung eine hohe Reproduzierbarkeit der Bestrahlungen innerhalb der einzelnen Applikationsmodi. Allerdings weichen die Dosismittelwerte im kontinuierlichen und im gepulsten Modus um etwa zwei Gray beziehungsweise 10 % voneinander ab. Der Unterschied ist deutlich größer als die statistischen Fehler der Dosismittelwerte von 0,27 Gy im kontinuierlichen bzw. 0,14 Gy im gepulsten Modus und somit durch statistische Streuung alleine nicht erklärbar.

Eine ausführliche Diskussion über Ursachen und mögliche Gründe für diese Diskrepanz ist in [Sie10] zu finden, worin etwa die Hälfte dieses Unterschieds erklärt werden kann. Hierzu tragen zum einen der Ausreißer im kontinuierlichen Modus mit 1 % bei. Zum anderen sind im kontinuierlichen Modus die $3\text{ mm} \times 2\text{ mm}$ Felder nicht exakt rechteckig, sondern leicht trapezförmig, was zu einem kleinen Überlapp und somit zu einer um etwa 2 % größeren Dosis führt (vgl. 4.2.2). Desweiteren unterschätzt die verwendete Auswertungsmethodik die Dosis im gepulsten Modus aufgrund der etwas geringeren räumlichen Homogenität leicht, im Mittel um etwa 2 %. Die verwendete Methodik mittelt zuerst die Verdunkelung des Films über die bestrahlte Fläche um aus diesem Mittelwert über die Kalibrierkurve auf die Dosis zu schließen. Wegen der positiven Krümmung der Kalibrierkurve wird die mittlere Dosis, abhängig von der Breite der Verteilung der Dosiswerte, leicht unterschätzt.

Die vor der Bestrahlung durchgeführte Kalibrierung des Strahlstroms zwischen dem Target und dem letzten Cup, „I+0Cup1“, wurde nach jeder Bestrahlung nochmals kontrolliert und erwies sich als stabil. Vor allem war im gepulsten Modus kein Trend zu geringeren Strahlströmen nach der Bestrahlung ersichtlich. Auch die Größen der $3\text{ mm} \times 2\text{ mm}$ Felder, welche in die Fluenzberechnung eingehen, können mit einer relativen Genauigkeit von unter einem Prozent zueinander vermessen werden und scheiden als Ursache der Dosisabweichung aus. So bleiben die restlichen 5 % des Dosisunterschieds bis zum jetzigen Zeitpunkt unverstanden. Als weitere Ursache ist eine mögliche Dosisratenabhängigkeit der beiden Messmethoden, Cupstrommessung bzw. Gafchromfilm, zu diskutieren.

Die Farbänderung der Gafchrom Filme wird durch Radikale getriggert. Bei hohen Radikalkonzentrationen, wie sie bei hohen Dosisleistungen entstehen, ist eine gegenseitige Neutralisation von Radikalen nicht auszuschließen. Diese würde die Farbänderung

reduzieren und so die Dosis unterschätzen. Aktuelle Untersuchungen mit gepulsten Elektronenstrahlen [Kar12] zeigen eine Obergrenze für die Dosisratenabhängigkeit von Gafchromfilmen von 2 % bis 4×10^9 Gy/s bzw. 5 % bis $1,5 \times 10^{10}$ Gy/s. Allerdings lag die Pulslänge dieser Messungen bei 5 ps, was auf eine maximale pro Puls applizierte Dosis von nur 45 mGy schließen lässt. Diese ist etwa ein bis zwei Größenordnungen geringer als in den hier durchgeführten Experimenten, was eine Anwendung der Ergebnisse auf den hiesigen Falle verhindert.

Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass aufgrund des gepulsten Stromflusses die Strommessung verfälscht wird. Im gepulsten Modus kommen, je nach Frequenzumsetzung des Pulsungssystems, alle 6,4 μ s bis 51,2 μ s ein Strahlstimpuls von 1,3 ns Länge im Faradaycup an, was einem Verhältnis von Pulslänge zu Pulsabstand von $2,5 \times 10^{-5}$ bis $2,0 \times 10^{-4}$ entspricht. Der Peakstrom des Strahls liegt damit vier bis fünf Größenordnungen über dem Mittelwert, welcher die Messgröße darstellt. Mögliche Nichtlinearitäten im Ansprechverhalten des Messgeräts würden die Messung verfälschen.

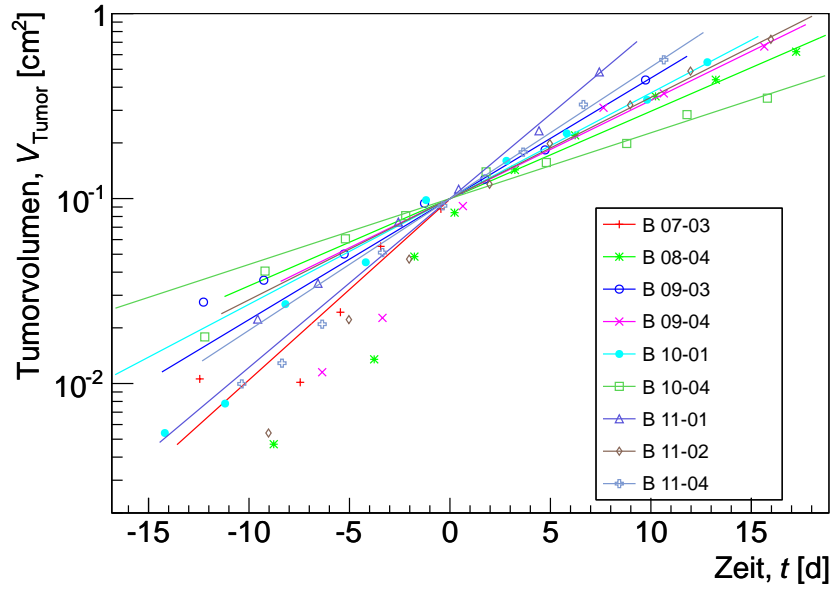
Obwohl die Dosisdiskrepanz bis jetzt ungeklärt ist, dient der Vergleich zwischen mittels Strahlstrom eingestellter Dosis und mittels Gafchromfilmen rekonstruierter Dosis als Abschätzung der systematischen Dosisunsicherheit zwischen den beiden Bestrahlungsmodi. Für diese wird im Folgenden 5 % angenommen.

In den Gesamtfehler der mittleren applizierten Dosis, $\Delta_{\bar{D}}$, gehen neben dem statistischen Fehler des Mittelwerts folgende weitere Fehler ein, welche quadratisch addiert wurden: Die statistischen Unsicherheiten der Parameter der Kalibrierkurve führen zu einem relativen Dosisfehler von 3 %, die Absolutkalibrierung besitzt ebenfalls einen Fehler von 3 % (4.2.5). Im gepulsten Modus trägt zusätzlich die Unsicherheit durch die positiv gekrümmte Kalibrierkurve mit 2 % und die Unsicherheit zwischen beiden Bestrahlungsmodi mit 5 % bei. Die Gesamtfehler der mittleren applizierten Dosen liegen im kontinuierlichen Modus bei 5 %, im gepulsten Modus bei 7 % und sind für die verschiedenen Bestrahlungsgruppen ebenfalls in Tab. 4.2 aufgeführt.

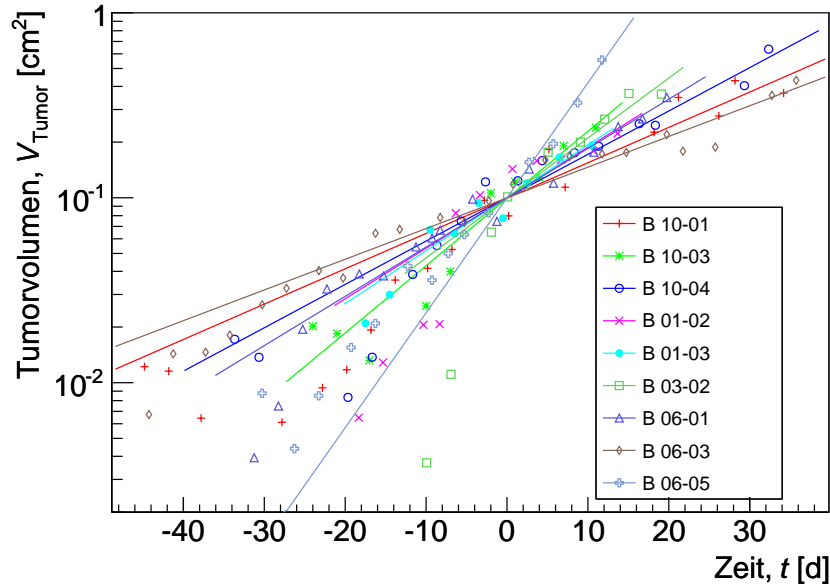
4.4 Wachstumsverzögerung nach gepulster bzw. kontinuierlicher Dosisapplikation

4.4.1 Wachstum unbestrahlter Kontrolltumore

Abb. 4.11 zeigt die Wachstumskurven von unbestrahlten FaDu bzw. XF354 Tumoren, welche als Referenz für die Bestimmung der Wachstumsverzögerung nach Protonenbestrahlung dienen. Die Daten wurden für jeden Tumor einzeln mit einem exponentiellen



(a) FaDu, unbestrahlt



(b) XF354, unbestrahlt

Abbildung 4.11: Die Wachstumskurven von unbestrahlten FaDu bzw. XF354 Tumoren in halblogarithmischer Auftragung sind einzeln, unter der Annahme eines exponentiellen Wachstums, $V_{Tumor} = V_0 \cdot \exp(t/\tau)$, gefittet. Da als Referenz zur Bestimmung der Wachstumsverzögerung nur die Wachstumsgeschwindigkeit der Tumore nach der Anwachsphase von Bedeutung ist, wurde der Zeitnullpunkt, zur visuellen Darstellung, für jeden Tumor so gelegt, dass alle Fitkurven am Tag $t=0$ d das Volumen $V=0,1 \text{ cm}^3$ erreichen. Man beachte die unterschiedlichen Zeitskalen für FaDu und XF354 Tumore. Die mittleren Wachstumszeiten τ sind in Gl. 4.3 angegeben.

Wachstum, $V_{\text{Tumor}} = V_0 \cdot \exp(t/\tau)$, gefittet, was die Kurven ab einem Volumen von etwa $0,05 \text{ cm}^3$ und damit in dem zum Vergleich mit bestrahlten Tumoren relevanten Größenbereich gut beschreibt. Durch Mittelung der Wachstumszeiten der einzelnen Fits ergeben sich die mittleren Wachstumszeiten und deren Fehler zu:

$$\begin{aligned}\bar{\tau}_{\text{FaDu}} &= (7,4 \pm 0,8) \text{ d} \\ \bar{\tau}_{\text{XF354}} &= (16,4 \pm 1,9) \text{ d}\end{aligned}\tag{4.3}$$

Die Standardabweichung der Wachstumszeiten betragen $\sigma_{\tau, \text{FaDu}} = 2,4 \text{ d}$ bzw. $\sigma_{\tau, \text{XF354}} = 5,7 \text{ d}$. Die mittlere Zeit zum Verdreifachen des Volumens beträgt für die XF354 Tumore $\bar{t}_{3, \text{XF354}} = (18,0 \pm 2,1) \text{ d}$ und für FaDu $\bar{t}_{3, \text{FaDu}} = (8,2 \pm 0,9) \text{ d}$.

4.4.2 XF354

Abb. 4.12 zeigt die nach Protonenbestrahlung mit $(19,4 \pm 0,9) \text{ Gy}$ im kontinuierlichen bzw. $(17,9 \pm 1,3) \text{ Gy}$ im gepulsten Modus gemessenen Wachstumskurven von XF354 Tumoren. Von fünf kontinuierlich bzw. von sechs gepulst bestrahlten Tumoren erreicht jeweils nur ein Tumor das dreifache Volumen des Bestrahlungszeitpunkts. Die restlichen Tumore sind lokal kontrolliert, was einer Kontrollwahrscheinlichkeit von $(80 \pm 16)\%$ im kontinuierlichen Modus bzw. $(83 \pm 18)\%$ im gepulsten Modus entspricht. Die angegebenen Fehler entsprechen der Standardabweichung der Binomialverteilung bei entsprechender Fallzahl und der gemessenen Kontrollwahrscheinlichkeit. Im Rahmen der Unsicherheiten ist der Unterschied der Kontrollwahrscheinlichkeiten in beiden Modi nicht signifikant.

Die beiden nicht kontrollierten Tumore benötigen nach Bestrahlung 53 d bzw. 121 d um das Volumen zu verdreifachen. Nach Abzug der Verdreifachungszeit unbestrahlter XF354 Tumore von 18 d, entspricht dies einer Wachstumsverzögerung von $\Delta t_{\text{kont.}} = 35 \text{ d}$ im kontinuierlichen Modus bzw. $\Delta t_{\text{gep.}} = 103 \text{ d}$ im gepulsten Modus. Die geringe Statistik von nur jeweils einem nicht kontrollierten Tumor erlaubt es nicht, die Streuung und damit den statistischen Fehler dieser Messung abzuschätzen. So ergibt sich zwar im gepulsten Modus eine etwa dreimal so große Wachstumsverzögerung, allerdings ist diese als nicht signifikant anzusehen.

4.4.3 FaDu

In Abb. 4.13 sind die Wachstumskurven der bestrahlten FaDu Tumore dargestellt. Diese zeigen sich deutlich weniger strahlensensitiv als die XF354 Tumore. Die Kontrollwahrscheinlichkeit liegt nach kontinuierlicher Protonenapplikation mit einer Dosis von

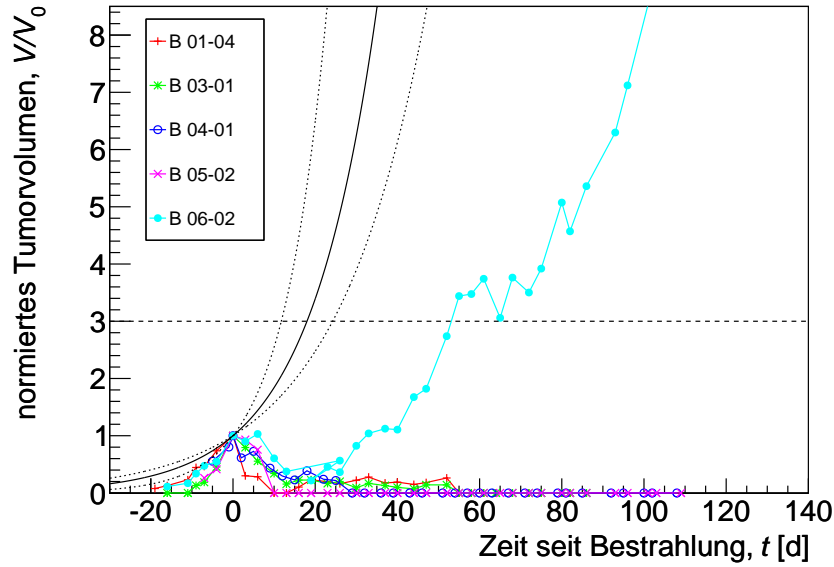
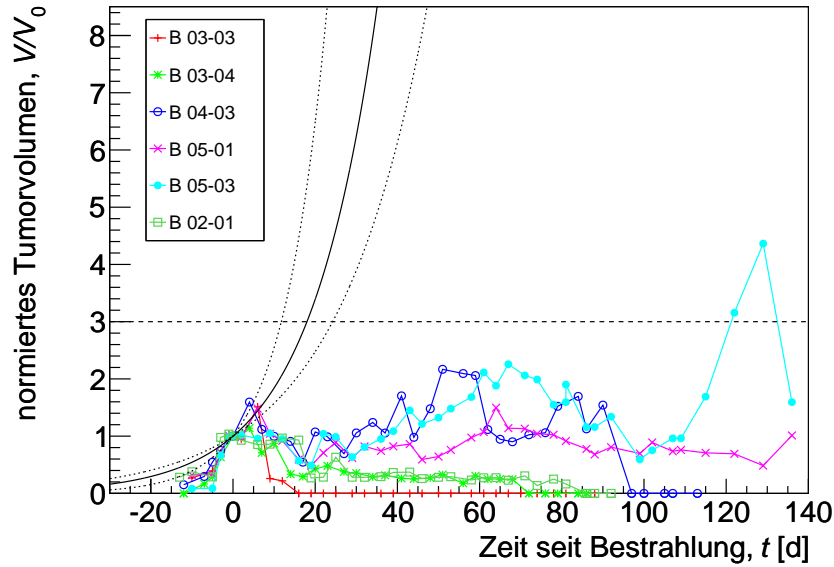
(a) XF354 nach kontinuierlicher Protonenbestrahlung mit $(19,4 \pm 0,9)$ Gy(b) XF354 nach gepulster Protonenbestrahlung mit $(17,9 \pm 1,3)$ Gy

Abbildung 4.12: Dargestellt sind die Wachstumskurven von XF354 Tumoren nach einer nicht fraktionierten Protonenbestrahlung mit einer nominellen Dosis von 20 Gy. Die Tumorumfängen, V , sind jeweils auf das Volumen zum Bestrahlungszeitpunkt, V_0 , normiert. Die schwarze Linie zeigt die exponentielle Wachstumskurve mit der mittleren Wachstumszeit unbestrahlter XF354 Tumore (durchgezogene Linie) bzw. der mittleren Wachstumszeit plus/minus der Standardabweichung (gepunktete Linie) und repräsentiert damit die Unsicherheit der Einzelmessung. Die schwarze gestrichelte Linie markiert das dreifache Bestrahlungsvolumen. Die Zeitspanne, welche die bestrahlten Tumore länger benötigen um das dreifache Volumen zu erreichen, definiert die Wachstumsverzögerung Δt .

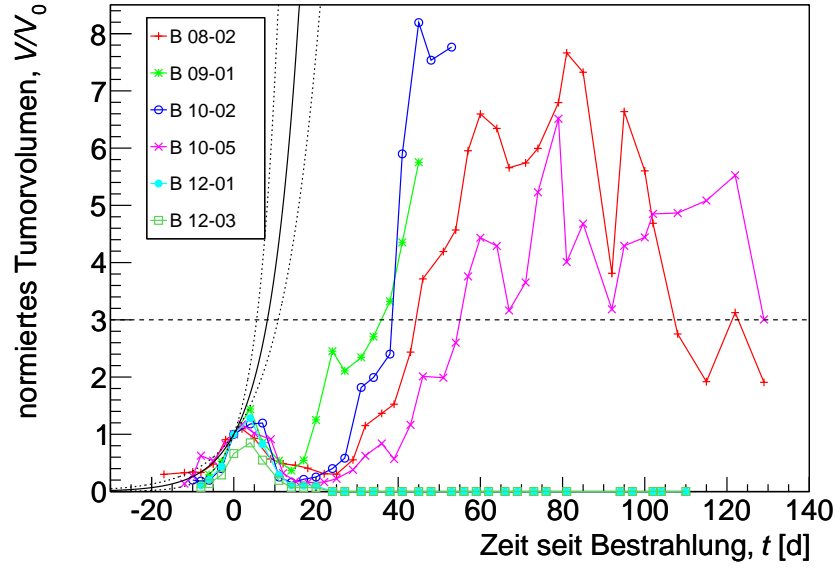
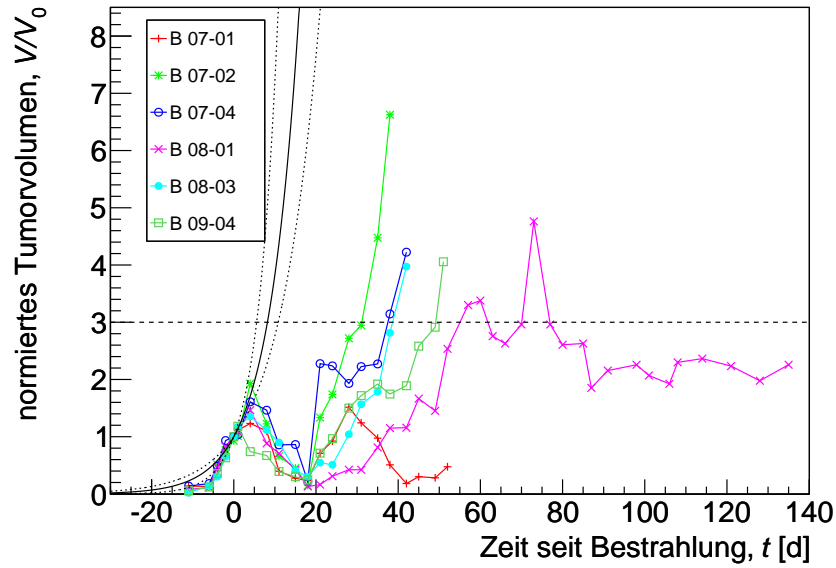
(a) FaDu nach kontinuierlicher Protonenbestrahlung mit $(19,7 \pm 1,0)$ Gy(b) FaDu nach gepulster Protonenbestrahlung mit $(17,4 \pm 1,2)$ Gy

Abbildung 4.13: Dargestellt sind die normierten Volumina, V/V_0 , der FaDu Tumore gegen die Zeit seit gepulster bzw. kontinuierlicher Protonenbestrahlung. Die schwarze Linie markiert das Wachstum mit der gemittelten Wachstumszeit, $\bar{\tau}_{\text{FaDu}}$, unbestrahlter FaDu Tumore, die gepunkteten Linien mit den Wachstumszeiten $\bar{\tau}_{\text{FaDu}} \pm \sigma_{\tau, \text{FaDu}}$. Die kontinuierlich bestrahlten, nicht kontrollierten Tumore erreichen im Mittel nach (43 ± 5) Tagen das dreifache Volumen des Bestrahlungszeitpunkts (gestrichelte Linie), die gepulst bestrahlten Tumore nach (42 ± 5) Tagen.

($19,4 \pm 1,0$) Gy mit zwei von sechs kontrollierten Tumoren bei (33 ± 20)%, im gepulsten Modus nach Applikation von ($17,4 \pm 1,2$) Gy mit einem von sechs lokal kontrollierten Tumor bei (17 ± 16)%. Die nach kontinuierlicher Dosisapplikation nicht kontrollierten Tumore erreichen das dreifache Bestrahlungsvolumen nach 36, 38, 44 und 55 Tagen, der Mittelwert beträgt: $\bar{t}_{3, FaDu, kont.} = (43 \pm 5)$ d. Die gepulst bestrahlten FaDu Tumore verdreifachen ihr Volumen in 29, 38, 39, 49 bzw. 55 Tagen, im Mittel in $\bar{t}_{3, FaDu, gep.} = (42 \pm 5)$ d. Unter Berücksichtigung der Verdreifachungszeit unbestrahlter FaDu Tumore von 8,2 Tagen (Gl. 4.3) ergibt sich die Wachstumsverzögerung, Δt , zu:

$$\begin{aligned}\overline{\Delta t}_{FaDu, kont.} &= (35 \pm 5) \text{ d} \\ \overline{\Delta t}_{FaDu, gep.} &= (34 \pm 5) \text{ d}\end{aligned}\tag{4.4}$$

Auch bei den FaDu Tumoren zeigt weder die Tumorkontrollwahrscheinlichkeit noch die Wachstumsverzögerung einen signifikanten Unterschied zwischen kontinuierlicher und gepulster Dosisapplikation.

4.4.4 Vergleich mit Röntgenbestrahlung

Um die relative biologische Wirksamkeit beider Applikationsmodi bestimmen zu können, wurden für die FaDu Tumorlinie Bestrahlungen mit Röntgenstrahlung an einem 6 MV Linearbeschleuniger (Trilogy, Varian, USA) am Klinikum Rechts der Isar von den Arbeitsgruppen um Jan J. Wilkens und um Thomas Schmid durchgeführt. Analog zu den Protonenexperimenten wurde jeweils nur eine Fraktion appliziert, wobei die Dosis zwischen 10 Gy und 40 Gy variiert wurde. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.14 und 4.15 dargestellt.

Abb. 4.14 zeigt die Wachstumsverzögerung gegen die Röntgendosis, sowie die beiden Messpunkte nach kontinuierlicher bzw. gepulster Protonenbestrahlung. Die Dosis-effektkurve folgt einem linearquadratischen Zusammenhang: $\Delta t = \alpha D + \beta D^2$. Der Fit liefert $\alpha = (0,8 \pm 0,4) \text{ d/Gy}$ und $\beta = (0,037 \pm 0,016) \text{ d/Gy}^2$. Die großen Fehler der Parameter sind durch die starke Antikorrelation dieser bedingt. Der Korrelationskoeffizient zwischen α und β beträgt $cor_{\alpha, \beta} = -0,91$. Die Röntgendosis, welche dieselbe Wachstumsverzögerung zur Folge hat, ergibt sich im kontinuierlichen Modus zu ($21,7 \pm 2,2$) Gy, im gepulsten Modus zu ($21,2 \pm 2,2$) Gy. Die Berechnung der Fehler wurde wie in 2.3 beschrieben unter Berücksichtigung der Parameterkorrelation von α und β durchgeführt. Für die gepulste Protonenbestrahlung ergibt sich eine relative biologische Wirksamkeit von $1,22 \pm 0,17$, für die kontinuierliche Applikation von $1,10 \pm 0,14$. Die Unsicherheit der applizierten Röntgendosis beträgt 6%.

In Abb. 4.15 ist der gemessene Anteil kontrollierter Tumore in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen dem 68,3% Konfidenzin-

tervall der Kontrollwahrscheinlichkeit bei gegebener Anzahl bestrahlter und kontrollierter Tumore. Zum Fit der Dosisabhängigkeit der Kontrollwahrscheinlichkeit, $p(D)$, wurde das in 2.2.2.1 diskutierte Poisson-Modell [Ben97] verwendet:

$$p(D) = \exp \left(-\ln 2 \cdot \exp \left(2a \frac{TCD_{50} - D}{\ln 2} \right) \right) \quad (4.5)$$

Gemäß dem Fit beträgt bei einer Dosis von $TCD_{50} = (24,2 \pm 1,9)$ Gy die Kontrollwahrscheinlichkeit gerade 50 %. Die Steigung an diesem Punkt ergibt sich zu $a = (0,072 \pm 0,023) \text{ Gy}^{-1}$, der Korrelationskoeffizient zwischen beiden Parametern zu $cor_{a,TCD_{50}} = -0,476$. Die gemessenen Kontrollwahrscheinlichkeiten nach gepulster und nach kontinuierlicher Protonenbestrahlung sind ebenfalls in Abb. 4.15 eingezeichnet. Die notwendige Röntgendosis um dieselbe Kontrollwahrscheinlichkeit wie nach Protonenapplikation zu erzeugen, beträgt für den kontinuierlichen Modus bei zwei von sechs kontrollierten Tumoren (22 ± 4) Gy, für den gepulsten Modus bei einem von sechs kontrollierten Tumoren (20 ± 4) . Im kontinuierlichen Modus ergibt sich nach Bestrahlung mit $(19,7 \pm 1,0)$ Gy ein RBE von $1,12 \pm 0,18$, im gepulsten Modus nach $(17,4 \pm 1,2)$ Gy ein RBE von $1,13 \pm 0,21$.

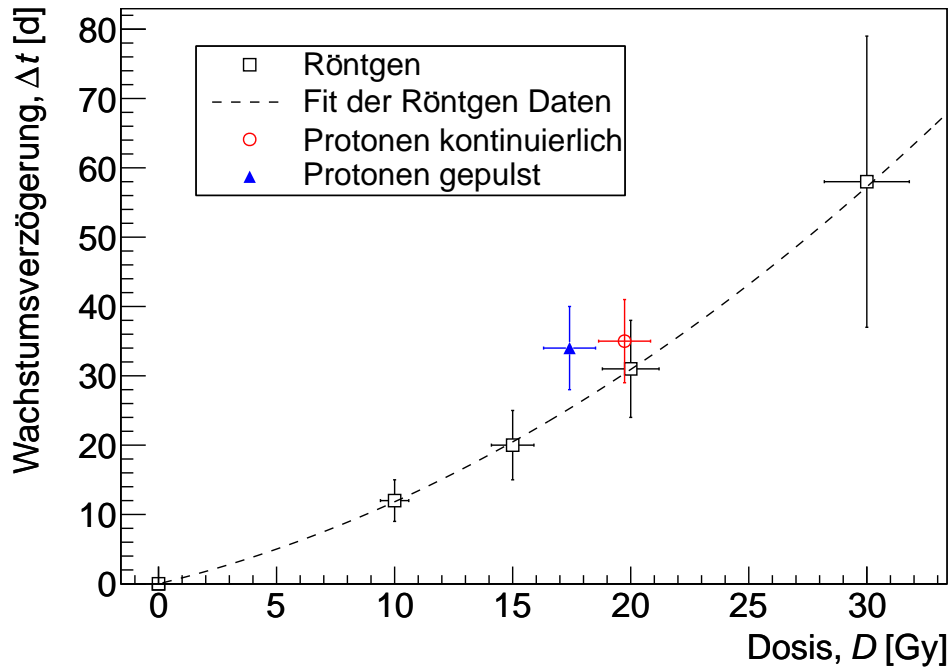


Abbildung 4.14: Dosis-effekt-kurve für die Wachstumsverzögerung von FaDu Tumoren nach Röntgenbestrahlung. Die Daten sind mit einer linearquadratischen Funktion, $\Delta t = \alpha D + \beta D^2$ gefittet. Ebenfalls eingetragen sind die gemessenen Wachstumsverzögerungen nach Protonenbestrahlung mit $(19,7 \pm 1,0)$ Gy im kontinuierlich Modus, bzw. $(17,4 \pm 1,2)$ Gy im gepulsten Modus.

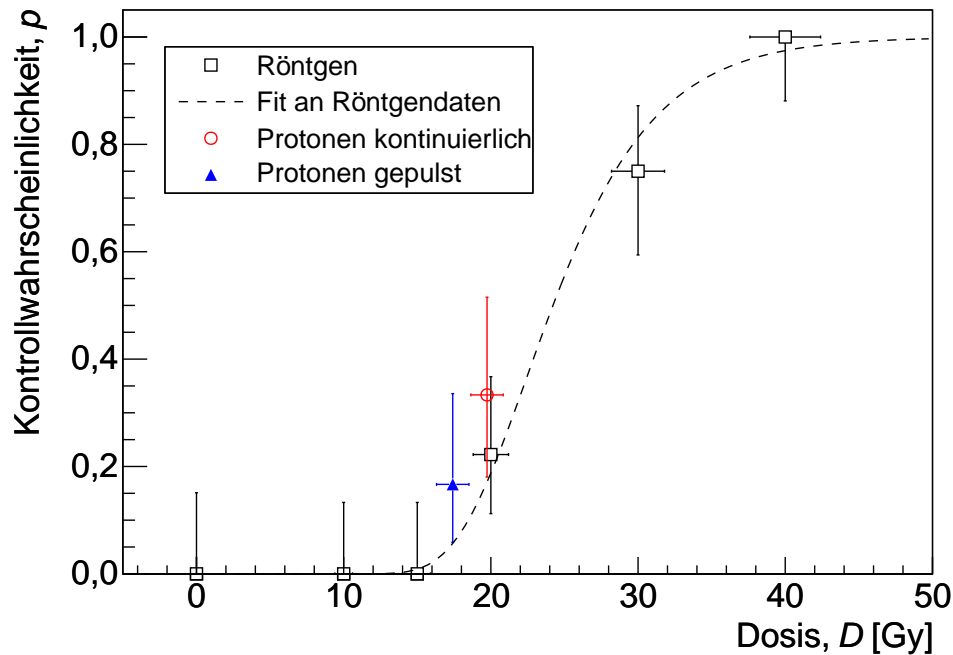


Abbildung 4.15: Wahrscheinlichkeit für lokale Tumorkontrolle in Abhängigkeit der Röntgendosis für FaDu Tumore. Der Verlauf ist mit dem Modell aus Gl. 2.11 gefittet. Demnach werden bei einer Dosis von $(24,9 \pm 1,9)$ Gy, dem sogenannten TCD_{50} Wert, die Hälfte aller behandelten Tumore lokal kontrolliert. Ebenfalls eingezeichnet sind die Kontrollwahrscheinlichkeiten nach kontinuierlicher und gepulster Protonenbestrahlung.

4.5 Diskussion

Die Bestrahlung von insgesamt 23 menschlichen Tumoren im Mausmodell mit einer Fraktion von nominell 20 Gy demonstriert die Einsatzfähigkeit des entwickelten Bestrahlungsaufbaus für strahlenbiologische Untersuchungen. 12 Tumore wurden erstmals mit einzelnen, 1,3 ns langen Protonenpulsen bestrahlt um die radiobiologische Eignung von gepulsten Ionenstrahlen, wie sie nach Laserbeschleunigung zu erwarten sind, für die Tumorthherapie zu testen. Die Vergleichsexperimente mit sogenannter kontinuierlicher Dosisapplikation im Millisekundenbereich wurden am selben Aufbau durchgeführt um systematische Fehler in der Vergleichbarkeit zu minimieren. Die mittlere applizierte und mittels Gafchromfilmen rekonstruierte Dosis im kontinuierlichen Modus betrug 19,6 Gy, im gepulsten Modus 17,6 Gy. Die geringe Standardabweichung der Dosen innerhalb der einzelnen Modi von nur 2,7 % (gepulst) bzw. 4,5 % (kontinuierlich) zeigt die hohe Reproduzierbarkeit der Bestrahlungen. Der Unterschied der applizierten Dosen in beiden Modi ist zur Hälfte verstanden und kann somit in zukünftigen Experimenten reduziert werden. Die restlichen 5 % sind als Abschätzung der systematischen Unsicherheiten der Dosimetrie in beiden Modi anzusehen. In Anbetracht der um sieben bis acht Größenordnungen unterschiedlichen Dosisraten sind die Unsicherheiten von

5 % für strahlenbiologische Experimente vertretbar und in den meisten Fällen nicht limitierend.

Im gepulsten Modus konnten therapierelevante Dosen in einem oder wenigen Pulsen appliziert werden, was zur Untersuchung von Dosisrateneffekten essentiell ist. Die Dosis wurde voxelweise appliziert, wie es in der Protonentherapie Stand der Technik ist. Je nach Position im Zielvolumen liegt der größte Dosisbetrag eines einzelnen Pulses zwischen 1,0 Gy und 2,7 Gy. Die Anzahl der notwendigen Pulse zur Applikation der Hälfte der Gesamtdosis betrug zwischen 6 am Ende des Spread Out Bragg Peaks und 27 Pulsen an dessen vorderen Ende. Da zum jetzigen Zeitpunkt nicht davon auszugehen ist, dass bei einer Anwendung von lasergetriebenen Ionenstrahlen in der Tumorthherapie die Dosis in weniger Pulsen und damit bei höheren Dosisraten appliziert wird, stellen diese Bestrahlungen ein geeignetes Modellsystem dar.

Im Rahmen der Untersuchungen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Wirksamkeit von gepulster und kontinuierlicher Dosisapplikation festgestellt werden. Es wurde jeweils einer von sechs gepulst bzw. von fünf kontinuierlich bestrahlten XF354 Tumoren nicht lokal kontrolliert. Die beiden nicht kontrollierten Tumore zeigten eine deutlich unterschiedliche Wachstumsverzögerung von 35 d (kontinuierlich) bzw. 103 d (gepulst). Da eine statistische Auswertung der Messunsicherheit bei nur jeweils einem nicht kontrollierten Tumor nicht möglich ist, ist dieser Unterschied als nicht signifikant anzusehen. Aus diesem Grunde wurde auf Referenzbestrahlung mit 6 MV Röntgenstrahlung zur Bestimmung eines RBE-Wertes verzichtet. Die Wachstumsverzögerung der FaDu-Tumore wurde im gepulsten Modus nach Bestrahlung mit $(17,4 \pm 1,2)$ Gy zu (34 ± 5) d und im kontinuierlichen Modus nach $(19,7 \pm 1,0)$ Gy zu (35 ± 5) d gemessen, die relative biologischen Wirksamkeit bezüglich 6 MV Röntgenbestrahlung ergibt sich zu $1,22 \pm 0,17$ bzw. $1,10 \pm 0,14$. Ähnliches gilt für die Kontrollwahrscheinlichkeit: Im gepulsten Modus wurden eine, im kontinuierlichen Modus zwei von jeweils sechs bestrahlten Tumoren kontrolliert. Dies entspricht einem RBE von $1,13 \pm 0,21$ bzw. $1,12 \pm 0,18$. Die Aussagekraft dieses Wertes bei nur jeweils einem kontrollierten Tumor ist jedoch limitiert. Alle hier gemessenen RBE-Werte, sowohl nach kontinuierlicher als auch nach gepulster Dosisapplikation, sind im Rahmen ihrer Fehler mit dem in der Protonentherapie zur Dosisplanung verwendeten Wert von 1,1 [Pag02] verträglich.

Die gemessenen RBE-Werte sind in Einklang mit vorangegangenen Untersuchungen zu Nanosekunden gepulster Dosisapplikation. Bei Experimenten mit den hier vorgestellten gepulsten Protonenstrahl konnten weder bezüglich des Endpunkts der Chromosomenaberration auf Zellebene [Sch09, Sch11] bzw. im Gewebemodell [Sch10b] noch in der Koloniebildungsfähigkeit von HeLa Zellen [Aue11] signifikante Unterschiede zwischen gepulst und kontinuierlich applizierter Protonenbestrahlung gemessen werden.

Erste Experimente mit laserbeschleunigten Protonen zeigen ebenfalls keine Hinwei-

se auf eine unterschiedliche Wirkung von gepulster Dosisapplikation. [Yog11] bestimmte den RBE für 10 % Zellüberleben von Zellen eines Speicheldrüsentumors nach Bestrahlung mit 20 ns langen 0,2 Gy Protonenpulsen von 2,25 MeV Protonen zu $1,20 \pm 0,11$. In [Dor12] wurden Dosen bis zu 5 Gy mit einem einzelnen Protonenpuls mit Energien zwischen ein und fünf MeV deponiert. Der RBE für Zellüberleben von V79-Zellen wurde zu $1,4 \pm 0,2$ bestimmt. In [Bin12] wurde der RBE für die Induktion von γ -H2AX Foci nach Bestrahlung mit Einzelpulsen von 5,2 MeV Protonen bei Dosen bis 1,5 Gy zu $1,3 \pm 0,3$ bestimmt. Diese drei Arbeiten verzichteten auf direkte Vergleichsmessungen mit kontinuierlicher Protonenbestrahlung, sehen ihre Daten aber im Einklang mit Literaturwerten nach kontinuierlicher Protonenbestrahlung mit vergleichbaren LET-Werten.

Aus experimenteller Sicht gibt es bis jetzt keine Anzeichen für eine veränderte Wirksamkeit gepulster Dosisdeposition. Physikalisch betrachtet führt eine Dosisdeposition zur Ionisation von Molekülen im Targetvolumen, eine gepluste Dosisdeposition könnte durch Interaktion gleichzeitig vorhandener Ionisierungen die Wirkung der Dosis modifizieren. Im Folgenden soll abgeschätzt werden, welcher Bruchteil der Moleküle im Targetvolumen ionisiert wird und wie groß der mittlere räumliche Abstand der Ionisationsereignisse ist. Geht man von Wasser als Targetmaterial aus, so berechnet sich die Teilchenzahl von einem Kilogramm zu $1 \text{ kg} \cdot N_A / M_{H_2O} = 3,33 \times 10^{25}$, wobei N_A die Avogadrokonstante und $M_{H_2O} = 18 \text{ g/mol}$ die molare Masse von Wasser bezeichnet. Eine Bestrahlung mit einer Dosis von einem Gray deponiert in einem Kilogramm eine Energie von einem Joule. Geht man davon aus, dass pro 30 eV deponierter Energie im Mittel ein H_2O Molekül ionisiert wird, so werden durch die Deposition von einem Joule etwa $N_I = 1 \text{ J} / 30 \text{ eV} = 2,08 \times 10^{17}$ Moleküle ionisiert. Der Anteil der ionisierten Moleküle beträgt somit etwa $6,25 \times 10^{-9}$. Der mittlere Abstand der ionisierten Moleküle ergibt sich zu $\sqrt[3]{1 \text{ dm}^3 / N_I} = 170 \text{ nm}$. Selbst bei einer Bestrahlung mit 10 Gy beträgt der mittlere Abstand der Ionisationen immer noch etwa 80 nm. Eine mögliche Interaktion von gleichzeitig vorhandenen Ionisationen ist bei diesem Abstand unwahrscheinlich, so dass man davon ausgehen muss, dass die physikalischen Abläufe nahezu unbeeinflusst voneinander ablaufen und somit auf physikalischer Ebene keine veränderte Wirkung zu erwarten ist. Eine veränderte Wirksamkeit gepulster Dosisdeposition wäre allenfalls durch chemische oder biologische Effekte erklärbar, wofür es aber bisher keine Anzeichen gibt.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit ist für Pulsdauern größer einer Nanosekunde und Dosisdepositionen in der Größenordnung von einem Gray pro Puls davon auszugehen, dass laserbeschleunigte Protonen die gleiche Wirksamkeit in der Tumorthherapie entfalten wie Protonen gleicher Energie aus konventionellen Beschleunigern, welche die Dosis auf einer Zeitskala von Millisekunden applizieren. Es ist zu vermuten,

dass die Zeitstruktur der Dosisdeposition einer eventuellen Anwendung der Laserbeschleunigung in der Tumorthherapie nicht jenseits der hier betrachteten ein Gray pro Nanosekunde liegen wird. Dies hängt jedoch von der konkreten Realisierung der Protonenbeschleunigung und der Dosisapplikation ab.

Kapitel 5

RBE Erhöhung durch fokussierte Protonenbestrahlung

Schwere Ionen zeigen eine im Vergleich zu niedrig-LET Strahlung deutlich erhöhte biologische Wirksamkeit, welche in der Modellierung auf die unterschiedliche räumliche Dosisverteilung zurückgeführt wird. Im Folgenden wird beschrieben wie durch Verwendung eines Ionenmikrostrahls die Dosisverteilung von 20 MeV Protonen, welche mit einem LET in Wasser von $2,65 \text{ keV}/\mu\text{m}$ zu niedrig-LET Strahlung gehören, durch Fokussierung konzentriert und so die Dosisverteilung von Schwerionen approximiert wird. Mit diesem Modellsystem zur Untersuchung des Einflusses der Mikrodosisverteilung wird anhand der Endpunkte der Induktion von Mikrokernen und dizentrischen Chromosomen in A_L -Zellen die erhöhte biologische Wirksamkeit demonstriert und mit Vorhersagen des Local Effect Models verglichen.

5.1 Motivation

Abb. 5.1a zeigt zweidimensionale Dosisverteilung nach Bestrahlung mit statistisch verteilten 20 MeV Protonen (LET in Wasser: $2,65 \text{ keV}/\mu\text{m}$) bei einer Fluenz von $4,01 \mu\text{m}^{-2}$, Abb. 5.1b nach Bestrahlung mit einzelnen 55 MeV Kohlenstoffionen ($4,6 \text{ MeV}/\text{Nukleon}$; LET in Wasser: $310 \text{ keV}/\mu\text{m}$), welche in einer $5,4 \mu\text{m} \times 5,4 \mu\text{m}$ Matrix appliziert werden. Abb. 5.1d zeigt einen Schnitt durch diese Dosisverteilungen. Beide Bestrahlungsformen applizieren dieselbe mittlere Dosis von $1,7 \text{ Gy}$. Die Dosisverteilungen sind unter Verwendung des Trackstrukturmodells des Local Effect Models [Els08] (vgl. 2.4.1.1) berechnet, welches den Erwartungswert für die Dosis im Abstand zum Zentrum der Ionenspur beschreibt. Die dargestellten Dosisverteilungen mitteln somit über die Fluktuation der Dosisdeposition einzelner Ionen, nicht aber über die Verteilung der einzelnen Ionentreffer. Die Bestrahlung mit zufällig verteilten Protonen resultiert, wie für

niedrig-LET-Bestrahlung kennzeichnend, in einer mehr oder weniger homogenen Dosisverteilung mit einzelnen Dosispitzen bis zu 10^2 Gy an den Trefferstellen einzelner Protonen (Abb. 5.1a und 5.1d). Auch wenn die Dosis direkt an den Trefferpunkten fast zwei Größenordnungen über der mittleren Dosis liegt, so ist dennoch die dort deponierte Energie und damit der induzierte Schaden gering. Geht man von 30 Doppelstrangbrüchen pro Gray und Zellkern und einer Zellkernfläche von $100 \mu\text{m}^2$ aus, so

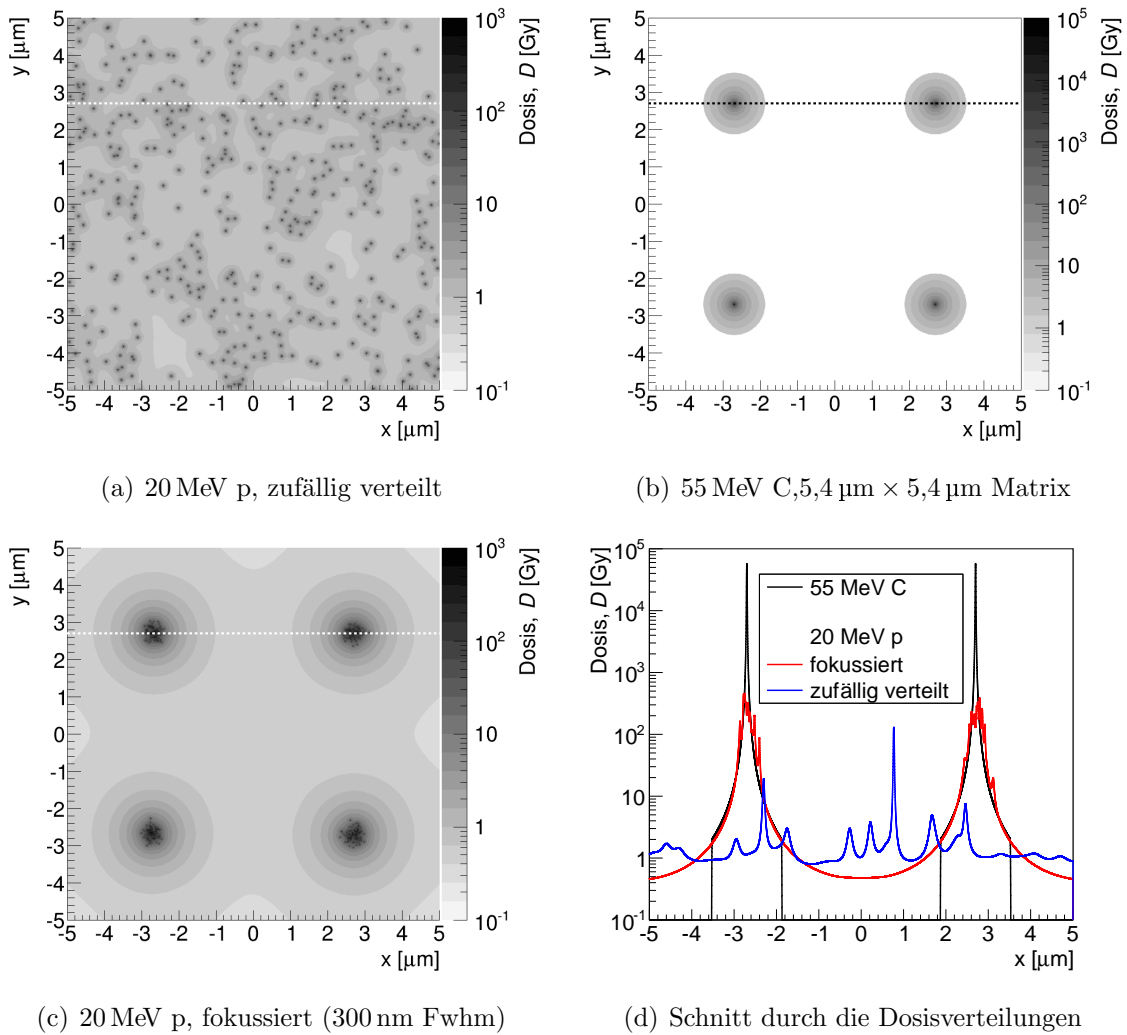


Abbildung 5.1: Simulierte zweidimensionale Dosisverteilung nach 1,7 Gy Bestrahlung mit zufällig verteilten 20 MeV Protonen (a), mit einzelnen in einer $5,4 \mu\text{m} \times 5,4 \mu\text{m}$ Matrix applizierten 55 MeV Kohlenstoffionen (b) und mit 117 auf 300 nm (volle Halbwertbreite) fokussierten 20 MeV Protonen, ebenfalls in einer $5,4 \mu\text{m} \times 5,4 \mu\text{m}$ Matrix appliziert, (c). (d) zeigt jeweils einen Schnitt durch die drei Dosisverteilungen entlang der in (a)–(c) eingezeichneten gestrichelten Linie bei $y = 2,7 \mu\text{m}$. Als Grundlage der Simulation dient das Trackstrukturmodell aus Gl. 2.19 [Els08]. Man beachte die unterschiedliche Dosis-Skala für Protonen und Kohlenstoffionen.

erwartet man nur bei jedem achten Protonentreffer einen Doppelstrangbruch. Im Gegensatz hierzu ist die Dosis bei Bestrahlung mit einzelnen 55 MeV Kohlenstoffionen massiv um die Ionenspuren konzentriert. Die maximalen lokalen Dosen direkt in den Ionenspuren sind mit 58 kGy fast 500-mal größer als die zu erwartenden maximalen Dosen bei Protonenbestrahlung. Die Dosis fällt radial mit dem inversen Quadrat des Abstands von der Ionenspur ab. Ab einem Abstand von etwa 1,1 μm zum Trefferpunkt deponieren 55 MeV Kohlenstoffionen im Rahmen dieses Trackstrukturmodell keine Dosis mehr.

Eine qualitativ ähnlich Dosisverteilung mit starker Konzentration an einzelnen Punkten lässt sich auch durch die Fokussierung von niedrig-LET Strahlung erreichen. Abb. 5.1c und Abb. 5.1d zeigen die Dosisverteilung von fokussierten 20 MeV Protonen, welche in einer 5,4 $\mu\text{m} \times 5,4 \mu\text{m}$ Matrix mit jeweils 117 Protonen pro Matrixpunkt appliziert werden. Die Verteilung der Protonen um die Matrixpunkte wird hier mit einer zweidimensionalen Gausverteilung mit 300 nm voller Halbwertsbreite modelliert. Durch die Fokussierung der Protonen wird die Dosis um die Matrixpunkte konzentriert, ähnlich wie bei Bestrahlung mit einzelnen Kohlenstoffionen. Die maximalen Dosiswerte erreichen das Vierfache von einzelnen Protonen, sind aber noch zwei Größenordnungen kleiner als direkt in der Spur eines 55 MeV Kohlenstoffions. Abgesehen von der Spitze des Peaks sind die Verteilungen von fokussierten Protonen und Kohlenstoffionen im Bereich von 100 nm bis 1,1 μm um die Ionenspur und somit im Dosisbereich zwischen 2 und 300 Gy nahezu identisch. Aufgrund der doppelten Geschwindigkeit der 20 MeV Protonen von etwa 20 % der Lichtgeschwindigkeit ist die radiale Dosisverteilung weiter ausgedehnt, so dass im Gegensatz zu den Kohlenstoffbestrahlungen keine Bereiche zwischen den Matrixpunkten ohne Dosisdeposition existieren. Zwischen den Trefferpunkten fällt die Dosis bis auf 0,4 Gy, weniger als ein Viertel der mittleren Dosis, ab.

Die Simulation zeigt, durch Fokussierung von niedrig-LET Strahlung kann die Dosisverteilung, wie für hoch-LET Strahlung typisch, räumlich konzentriert und lokal überhöht werden.

5.2 Versuchsdurchführung

Um die Frage zu klären, ob die veränderte Dosisverteilung nach fokussierter Protonenbestrahlung ähnliche Effekt, vor allem eine erhöhte biologische Wirksamkeit, induziert wie Schwerionenbestrahlung, wurde die Wirksamkeit der drei oben diskutierten Bestrahlungsmodi bezüglich der Induktion von Mikrokernen (2.2.1.2) und von dizen-trischen Chromosomen (2.2.1.1) in A_L -Zellen gemessen. Im Gegensatz zur Messung des klonogenen Zellüberlebens reicht für diese beiden Endpunkte eine deutlich kleinere Anzahl von bestrahlten Zellen und somit eine deutlich kleinere bestrahlte Fläche

von etwa 10 mm^2 zur Messung von dizentrischen Chromosomen und weniger als 1 mm^2 zur Messung von Mikrokernen aus, was die Durchführung am Rasterionenmikroskop SNAKE, in der damaligen Ausbaustufe, erst ermöglichte.

Bei den verwendeten A_L -Zellen handelt es sich um Eierstockzellen des Chinesischen Hamsters, sogenannte CHO-Zellen (englisch: „chinese hamster ovary“). Neben den Chromosomen des Chinesischen Hamsters besitzen diese Zellen zusätzlich das menschliche Chromosom 11 [Sch12]. Die im mittel nur 21 Chromosomen [Sch11] erleichtern das Auszählen der Aberrationen in der Metaphase. Das zusätzliche menschliche Chromosom ist für diesen Endpunkt nicht von Bedeutung.

Die Bestrahlung der drei Modi mit abgezählten Ionen wird in dem in Kap. 3 beschriebenen Einzelionenmodus von SNAKE durchgeführt. Die mittlere Dosis beträgt für alle drei Modi jeweils $1,7\text{ Gy}$. Um diese Dosis mit 20 MeV Protonen zu deponieren ist eine Fluenz von $4,01\text{ }\mu\text{m}^{-2}$ notwendig. Für die quasihomogene Bestrahlung mit zufällig verteilten Protonen wird der fokussierte Protonenstrahl in X- und Y-Richtung mit einer Auslenkung von $\pm 250\text{ }\mu\text{m}$ unkorreliert von den registrierten Teilchen vielfach über die Probe gescannt bis die notwendige Teilchanzahl im Detektor nachgewiesen ist. Für die Matrixbestrahlungen werden an jedem Punkt der $5,4\text{ }\mu\text{m} \times 5,4\text{ }\mu\text{m}$ Matrix mit $500\text{ }\mu\text{m}$ Seitenlänge entweder 117 Protonen oder einzelne Kohlenstoffionen appliziert. Zur Messung der Mikrokerninduktion erfolgt die Präparation (vgl. 2.2.1.2) direkt auf der Zellträgerfolie. Somit reicht ein einziges solches $500\text{ }\mu\text{m} \times 500\text{ }\mu\text{m}$ Feld aus. Für die Quantifizierung von dizentrischen Chromosomen hingegen müssen die Zellen von der Trägerfolie abgelöst werden. Um sicherzustellen, dass nur bestrahlte Zellen weiter prozessiert werden, werden mehrere dieser $500\text{ }\mu\text{m} \times 500\text{ }\mu\text{m}$ Felder durch mechanisches Verschieben der Probe, welche auf dem XY-Tisch des gekippten Mikroskops (vgl. Abb. 3.2a) montiert ist, nebeneinander gesetzt bis eine kreisförmige Fläche mit 3 mm Durchmesser bedeckt ist. Aus der Mitte dieser Fläche wird ein rundes Stück Zellträgerfolie mit 1 mm Durchmesser ausgestanzt und die darauf befindlichen Zellen weiter prozessiert. Die weitere Prozessierung der Zellen geschieht wie in 2.2.1 beschrieben.

Um die relative biologische Wirksamkeit der drei Bestrahlungsmodi zu bestimmen wurden zusätzlich Dosiseffektkurven von 0 bis 4 Gy mit 200 kV Röntgenstrahlung (RS225, Gulmay Medical, Surrey, Großbritannien) für die Mikrokerninduktion und mit 70 kV Röntgenstrahlung (Phillips RT100, Philips Medcial Systems, Eindhoven, Niederlande) für die Induktion von dizentrischen Chromosomen aufgenommen.

Die Präparation und Prozessierung der Zellen wurde von der Gruppe um Thomas Schmid, das Auszählen der Aberrationen von Thomas und Ernst Schmid durchgeführt.

5.3 Messung von Chromosomenaberrationen

Abb. 5.2 zeigt ein Fluoreszenzmikroskopbild von A_L -Zellen nach Bestrahlung in den drei verschiedenen Modi. Zur Visualisierung der DNA-Schadensorte ist das phosphorierte Histon γ -H2AX, welches sich in der Umgebung von Doppelstrangbrüchen bildet, angefärbt. Das Fluoreszenzsignal spiegelt somit, zumindest qualitativ, die Dosisverteilung wieder. Nach quasihomogener Protonenbestrahlung zeigt sich eine zufällige Doppelstrangbruchverteilung im Zellkern (Abb. 5.2b), während nach Matrixbestrahlung mit einzelnen Kohlenstoffionen nur entlang der Ionenspur DNA geschädigt wird und somit γ -H2AX-Signal auch nur in diesen Bereichen zu finden ist (Abb. 5.2a). Die fokussierte Protonenbestrahlung induziert die meisten Doppelstrangbrüche in der Umgebung der Matrixpunkte (Abb. 5.2c). Im Vergleich zur Kohlenstoffbestrahlung sind jedoch deutlich mehr Foci abseits der Trefferpunkte zu finden. Aufgrund der höheren Geschwindigkeit der 20 MeV Protonen reicht das radiale Dosisprofil bis zu größeren Abständen. Nach der in Abb. 5.1 dargestellten Simulation liegt der minimale Dosiswert zwischen den Punkten der $5,4\,\mu\text{m} \times 5,4\,\mu\text{m}$ Matrix immer noch bei etwa 0,4 Gy und damit bei etwa einem Viertel der mittleren Dosis. Somit sind auch etwa ein Viertel der

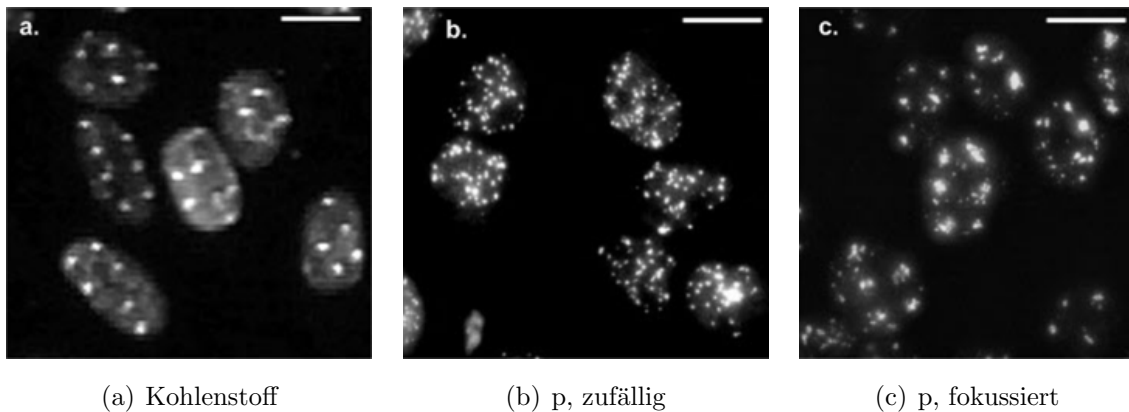


Abbildung 5.2: Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von A_L -Zellen nach Bestrahlung mit einzelnen 55 MeV Kohlenstoffionen in einer $5,4\,\mu\text{m} \times 5,4\,\mu\text{m}$ Matrix (a), zufällig verteilten 20 MeV Protonen (b) und fokussierten Protonen mit jeweils 117 Teilchen pro Matrixpunkt (c). Die Bestrahlung erfolgte in allen drei Fällen senkrecht zur Bildebene. Die Doppelstrangverteilung, welche mittels γ -H2AX Färbung visualisiert ist, spiegelt die Dosisverteilung wider. Während nach quasihomogener Protonenbestrahlung das Schadensmuster zufällig erscheint, sind nach Bestrahlung mit einzelnen Kohlenstoffionen nur Foci an den Trefferorten sichtbar. Nach Bestrahlung mit fokussierten Protonen zeigt sich eine starke Häufung der Doppelstrangbrüche um die Matrixpunkte. Abdruck der Abbildung aus [Sch12] mit freundlicher Genehmigung des Verlages. (©Institute of Physics and Engineering in Medicine. Published on behalf of IPeM by IOP Publishing Ltd. All rights reserved.)

Doppelstrangbrüche zufällig und unkorreliert zum Matrixmuster verteilt, was die im Vergleich zur Kohlenstoffbestrahlung erhöhte Focianzahl zwischen den Matrixpunkten erklärt.

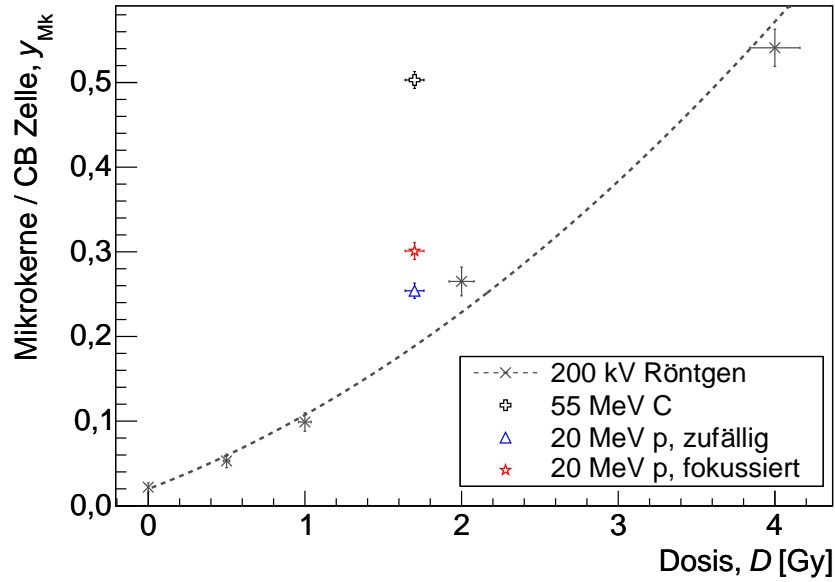
Desweiteren ist die Strahlauflösung des Protonenmikrostrahls nicht beliebig gut, was zusätzlich die visuell breiter erscheinenden Focicluster an den Matrixpunkten nach fokussierter Protonenbestrahlung erklärt. Eine Messung der Strahlauflösung mit Standardmethoden, wie STIM (englisch: „scanning transmission ion microscopy“, vgl. [Bre96]) oder das Ätzen der Ionentreffer in einem Kernspurdetektor, gestaltet sich aufgrund des niedrigen LET der verwendeten 20 MeV Protonen schwierig, so dass diese hier nur abgeschätzt werden kann. Eine untere Grenze für die Fokusgröße ergibt sich aus der ionenoptischen Abbildung zur Mikrostrahlpräparation. Durch Verkleinerung des $30\text{ }\mu\text{m} \times 10\text{ }\mu\text{m}$ großen Objekts auf $1/100$ in X- und $1/25$ in Y-Richtung resultiert ein Bild von $0,3\text{ }\mu\text{m} \times 0,4\text{ }\mu\text{m}$. Berechnet man aus dieser Rechteckverteilung die Standardabweichung und hieraus, unter Annahme einer Gaußverteilung, die volle Halbwertbreite so ergibt sich die untere Grenze des Strahldurchmessers zu etwa $200\text{ nm} \times 300\text{ nm}$.

Die Strahlauflösung im Einzelionenmodus an SNAKE ist durch periodische zur 50 Hz Netzspannung phasenkorrelierte Oszillationen begrenzt, welche durch magnetische Wechselfelder entlang des Strahlrohrs verursacht werden. Trotz der Korrektur mit einer 50 Hz Sinusoszillation phasenstarr zur Netzspannung limitieren höhere Ordnungen dieser Oszillation die Strahlauflösung. Mit 100 MeV Sauerstoffionen, $^{16}\text{O}^{+7}$, liegt die Strahlauflösung unter $0,7\text{ }\mu\text{m}$ in beide Richtungen [Hab04]. Selbst nach Skalierung mit dem Verhältnis der magnetischen Steifigkeiten von 100 MeV Sauerstoff und 20 MeV Protonen, welches etwa 0,8 beträgt, scheint eine Obergrenze der Strahlfleckgröße von einem Mikrometer realistisch. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird somit für die Strahlfleckgröße eine volle Halbwertsbreite von $(0,65 \pm 0,35)\text{ }\mu\text{m}$ angenommen.

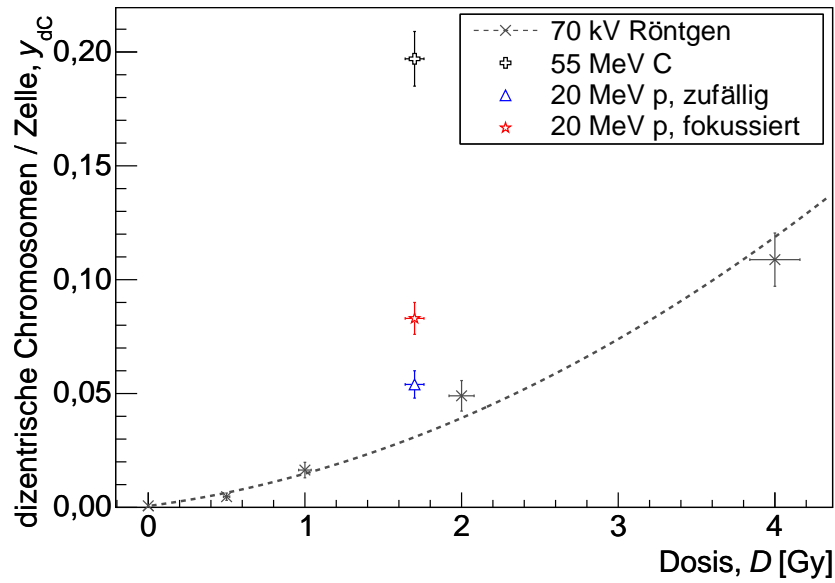
Zur Messung der Mikrokerninduktion wurden in drei Strahlzeiten zwischen sieben und neun Proben pro Bestrahlungsmodus, für die Induktion von dizentrischen Chromosomen vier Proben in zwei Strahlzeiten je Modus bestrahlt. Aus diesen Proben wurde jeweils die Häufigkeitsverteilung der Mikrokerne bzw. dizentrischen Chromosomen pro Zelle im Cytokinese Block (CB) bzw. pro Metaphase bestimmt. Im folgenden Abschnitt wird die Häufigkeit der gemessenen Chromosomenaberrationen, im Kap. 5.3.4 die Dispersionsindizes der Häufigkeitsverteilungen diskutiert.

5.3.1 Häufigkeit der Aberrationen

Abb. 5.3a zeigt die Aberrationshäufigkeit der verschiedenen Bestrahlungsmodi für die Induktion von Mikrokernen, Abb. 5.3b für die Induktion von dizentrischen Chromosomen, zusammen mit der jeweiligen Dosiseffektkurve nach Röntgenbestrahlung. Es



(a) Mikrokerne



(b) dizentrische Chromosomen

Abbildung 5.3: Mit Röntgenstrahlung gemessene Dosiseffektkurven für die Induktion von Mikrokernen und die Induktion von dizentrischen Chromosomen. Die Kurven wurden mit einem linearquadratischen Modell (vgl. Gl. 5.1) gefittet. Desweiteren sind die nach 1,7 Gy Bestrahlung mit zufällig verteilten Protonen, fokussierten Protonen und Kohlenstoffionen gemessenen Aberrationshäufigkeiten eingezeichnet.

zeigt sich ein für beide Endpunkte qualitativ einheitliches Bild. Die fokussierte Protonenbestrahlung induziert signifikant mehr Aberrationen als die homogen applizierte Protonenbestrahlung bei gleicher Dosis, wobei die Werte deutlich unter jenen nach Kohlenstoffbestrahlung liegen.

Durch die Fokussierung der Protonen wird die Ausbeute von $0,254 \pm 0,009$ Mikrokernen pro Zelle im CB Block für zufällig verteilte Protonen auf $0,301 \pm 0,010$ erhöht. Der Wert nach Kohlenstoffbestrahlung mit derselben Dosis von 1,7 Gy liegt mit $0,503 \pm 0,010$ Mikrokernen pro Zelle im CB Block nochmal deutlich höher.

Bezüglich der Induktion von dizentrischen Chromosomen erhöht die Fokussierung der Protonen die Ausbeute von $0,051 \pm 0,006$ pro Metaphase für zufällig verteilte Protonen um gut 60 % auf $0,083 \pm 0,007$. Die Kohlenstoffbestrahlung mit selber Dosis resultiert mit $0,197 \pm 0,009$ dizentrischen Chromosomen pro Metaphase in nochmals deutlich mehr Aberrationen.

5.3.2 Relative biologische Wirksamkeit

Zur Bestimmung der relativen biologischen Wirksamkeit wurden Dosiseffektkurven für die Induktion von Mikrokernen und von dizentrischen Chromosomen mit Röntgenstrahlung bis 4 Gy aufgenommen. Diese sind in Abb. 5.3 zusammen mit den Messpunkten nach Protonen- bzw. Kohlenstoffbestrahlung dargestellt. Die Dosisabhängigkeit wurde mit einem linearquadratischen Modell, der Form

$$y(D) = c + \alpha D + \beta D^2 \quad (5.1)$$

gefittet. Die Fittergebnisse inklusive Fehler, sowie die Nichtdiagonalelemente der Korrelationsmatrix der drei Parameter sind in Tab. 5.1 sowohl für die Induktion von Mikrokernen, als auch die Induktion von dizentrischen Chromosomen angegeben. Ebenso finden sich dort die hieraus berechneten RBE-Werte für die gepoolten Daten der drei Bestrahlungsmodi. Aufgrund der teilweise starken Korrelation der Fitparameter wurde diese zur Bestimmung der Unsicherheiten der RBE-Werte, wie in 2.3 beschrieben, berücksichtigt.

Für den Endpunkt der Mikrokerninduktion wird durch die fokussierte Applikation der Protonen der RBE von $1,28 \pm 0,07$ für zufällig verteilte Protonen auf $1,48 \pm 0,07$ erhöht. Der RBE für Bestrahlung mit 55 MeV Kohlenstoffionen bei gleicher Dosis von 1,7 Gy liegt mit $2,20 \pm 0,09$ nochmals deutlich höher.

Für die Induktion von dizentrischen Chromosomen liegt der RBE für zufällig applizierte 20 MeV Protonen bei $1,41 \pm 0,14$. Bei fokussierter Applikation erhöht sich dieser auf $1,92 \pm 0,15$. Die relative biologische Wirksamkeit für 55 MeV Kohlenstoffionen liegt

	Mikrokerne	dizentrische Chromosomen
c	$0,019 \pm 0,005$	$0,0006 \pm 0,0005$
α [Gy ⁻¹]	$0,077 \pm 0,012$	$0,010 \pm 0,003$
β [Gy ⁻²]	$0,014 \pm 0,004$	$0,0048 \pm 0,0012$
$\text{corr}(\alpha, \beta)$	$-0,918$	$-0,822$
$\text{corr}(\beta, c)$	$0,419$	$0,179$
$\text{corr}(c, \alpha)$	$-0,560$	$-0,297$
$y_{\text{Protonen, zufällig}}$	$0,254 \pm 0,009$	$0,051 \pm 0,006$
$y_{\text{Protonen, fokussiert}}$	$0,301 \pm 0,010$	$0,083 \pm 0,007$
$y_{\text{Kohlenstoff}}$	$0,503 \pm 0,010$	$0,197 \pm 0,009$
$\text{RBE}_{\text{Protonen, zufällig}}$	$1,28 \pm 0,07$	$1,41 \pm 0,14$
$\text{RBE}_{\text{Protonen, fokussiert}}$	$1,48 \pm 0,07$	$1,92 \pm 0,15$
$\text{RBE}_{\text{Kohlenstoff}}$	$2,20 \pm 0,09$	$3,21 \pm 0,27$

Tabelle 5.1: Resultierende Fitparameter inklusive Unsicherheiten und Parameterkorrelationen nach Anpassung eines linearquadratischen Modells (vgl. Gl. 5.1) an die nach Röntgenbestrahlung gemessenen Dosiseffektkurven. Desweiteren ist die Ausbeute an Mikrokernen und dizentrischen Chromosomen nach Bestrahlung mit zufällig verteilten Protonen, fokussierten Protonen und Kohlenstoffionen, sowie die sich hieraus ergebenden relativen biologischen Wirksamkeiten, RBE, aufgeführt.

hingegen bei $3,21 \pm 0,27$. Allerdings ist zur Bestimmung dieses RBE—Wertes die Dosiseffektkurve über den maximal gemessenen Dosiswert von 4 Gy hinaus bis fast 5,5 Gy zu extrapolieren.

5.3.3 Einfluss der Dosisverteilung auf die Aberrationshäufigkeit

Im quasihomogenen Bestrahlungsmodus folgt die Anzahl der Ionentreffer bei fester Zellkerngröße der Poisson-Statistik. Die mittlere maximale Querschnittsfläche von A_L-Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand von Mikroskopaufnahmen zu $(117 \pm 4) \mu\text{m}^2$ vermessen. Bei der für 1,7 Gy notwendigen Fluenz von $4,01 \mu\text{m}^{-2}$ ergibt sich eine mittlere Trefferanzahl von 469 Ionentreffern, die Standardabweichung beträgt 22 Ionentreffer oder etwa 5 %. Die Dosis schwankt somit nur wenig um den Mittelwert. Bei Bestrahlung in einer $5,4 \mu\text{m} \times 5,4 \mu\text{m}$ Matrix gibt es hingegen im Mittel nur etwa 4 Trefferpunkte pro Zellkern, allerdings ist diese Häufigkeit nicht Poisson-verteilt. Die regelmäßige Trefferverteilung lässt eine kleinere Streuung erwarten, eine

einfache Abschätzung ist allerdings schwierig. Die Breite der Dosisverteilung könnte im Zusammenspiel mit den positiv gekrümmten Dosiseffektkurven zu erhöhten Aberrationshäufigkeiten führen.

Um auszuschließen, dass die gemessenen Erhöhungen an Chromosomenaberrationen allein hierdurch bedingt sind, soll im Folgenden mittels einer einfachen Simulation die Breite der Dosisverteilung im fokussierten Modus und hiermit der Einfluss auf die Aberrationshäufigkeit abgeschätzt werden. Hierzu wird der Zellkern als Ellipsoid fester Größe mit wasseräquivalenter Dichte genähert, dessen eine Halbachse parallel zur Strahlrichtung liegt. Der Zellkern wird wiederholt zufällig relativ zum Bestrahlungsmuster plaziert und rotiert und an jedem Trefferpunkt die Länge der Ionenspur durch den Ellipsoid bestimmt und aufsummiert. Unter Vernachlässigung der radialen Dosisverteilung und der endlichen Strahlaufösung ergibt sich die deponierte Dosis als Quotient der Summe der Ionenspurlängen mal dem LET und der Masse des Zellkerns. Für die Simulation werden die Halbachsen senkrecht zur Strahlrichtung zu $7,48 \mu\text{m}$

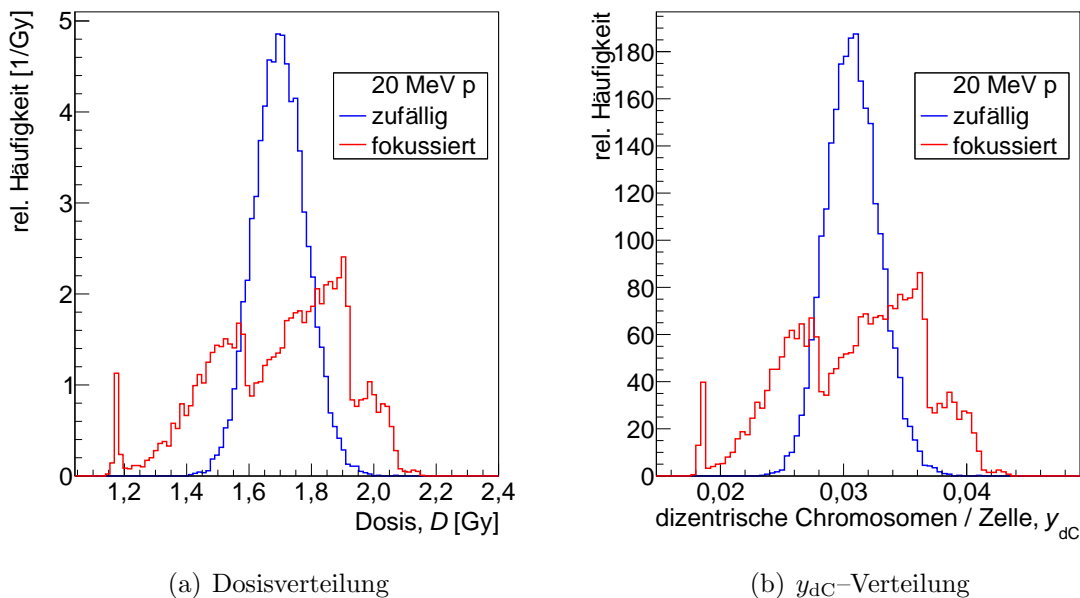


Abbildung 5.4: Ergebnisse der Simulation zum Einfluss der Breite der Dosisverteilung auf die Ausbeute an Chromosomenaberrationen. (a) zeigt die simulierte Dosisverteilung nach Bestrahlung mit zufällig verteilten Protonen (blau) bzw. nach Matrixbestrahlung im fokussierten Modus (rot). Die Dosisbreite nach Matixbestrahlung ist mit 9 % etwa doppelt so groß wie nach quasihomogener Bestrahlung. (b) zeigt Verteilung der Ausbeute an dizentrischen Chromosomen, welche aus der Dosisverteilung mithilfe der gemessenen Dosiseffektkurve berechnet wurde. Verglichen mit einer beliebig scharfen Verteilung führen die Breiten der Dosisverteilungen im Zusammenspiel mit der nichtlinearen Dosiseffektkurve zu einer leichten Zunahme der Induktion von dizentrischen Chromosomen um 0,11 % im quasihomogenen Modus und 0,39 % im Matrixmodus (vgl. Tab. 5.2).

und $4,98 \mu\text{m}$ gewählt, was der gemessenen mittleren maximalen Querschnittsfläche von $117 \mu\text{m}^2$ und einem Verhältnis der Halbachsen von $3/2$ entspricht. Die Höhe des Ellipsoiden ist für die Simulation unerheblich, da die Dosis nicht von dieser abhängt. Sowohl die Energiedeposition im Ellipsoiden als auch dessen Volumen skalieren mit dessen Höhe. Um die Auswirkung auf die Aberrationshäufigkeit abzuschätzen wird für jede simulierte Zelle aus der deponierten Dosis die zu erwartende Häufigkeit mittels der Dosiseffektkurve bestimmt. Zur Kontrolle wurde auch die Dosisverteilung nach Bestrahlung mit zufällig verteilten Protonen simuliert, wobei hier zuerst die Trefferanzahl einer Poisson-Verteilung folgend und danach die einzelnen Trefferpunkte zufällig gewürfelt wurden.

Abb. 5.4 zeigt die Histogramme für die Dosisverteilung und exemplarisch für die Induktion von dizentrischen Chromosomen. Tab. 5.2 fasst die Ergebnisse der Simulation tabellarisch zusammen.

Die simulierten Trefferanzahlen pro Zellkern und Dosen stimmen im Rahmen der statistischen Unsicherheit der Simulation mit den nominellen Werten überein. Während

		zufällig verteilte Bestrahlung	Matrix Bestrahlung	Dosisbreite vernachlässigt
Ionentreffer	\bar{N}	469,58	468,88	469,46
	$\sigma_{\bar{N}}$	0,22	0,91	-
	σ_N	21,63	91,01	-
	σ_N/\bar{N}	0,046	0,194	-
Dosis	\bar{D} [Gy]	1,7001	1,6986	1,7
	$\sigma_{\bar{D}}$ [Gy]	0,0009	0,0021	-
	σ_D [Gy]	0,083	0,21	-
	σ_D/\bar{D}	0,049	0,122	-
Mikrokerne	\bar{y}	0,190 66	0,190 99	0,190 55
	$\sigma_{\bar{y}}$	0,000 11	0,000 26	-
	σ_y	0,010	0,026	-
dizentrische Chromosomen	\bar{y}	0,030 777	0,030 914	0,030 741
	$\sigma_{\bar{y}}$	0,000 022	0,000 053	-
	σ_y	0,0022	0,0053	-

Tabelle 5.2: Ergebnisse der Simulation zum Einfluss der Dosisverteilung auf die Ausbeute von Chromosomenaberrationen. Angegeben sind jeweils der Mittelwert aus 10^4 simulierten Zellkernen, der statistische Fehler dessen und die Breite der Verteilung für die Trefferanzahl pro Zellkern, die Dosis, die Induktion von Mikrokernen und von dizentrischen Chromosomen nach Bestrahlung mit zufällig verteilten Protonen beziehungsweise nach Matrixbestrahlung.

die relative Breite der Trefferanzahlverteilung pro Zellkern im Matrixmodus mit 20 % fast viermal so groß ist wie nach quasihomogener Bestrahlung, besitzt die Dosisverteilung eine relative Breite von 12,2 % und liegt damit nur noch einen Faktor 2,5 über der Breite der zufällig verteilten Bestrahlung.

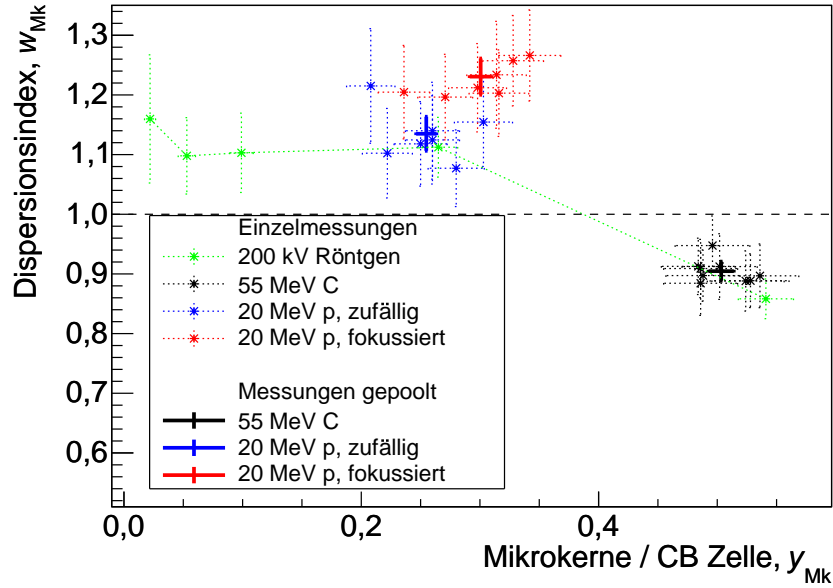
Aufgrund der Breite der Dosisverteilung zeigt die Simulation einen Anstieg der Ausbeute an dizentrischen Chromosomen um 0,12 % bei Bestrahlung mit zufällig verteilten Protonen und 0,56 % im Matrixmodus. Die Ausbeute an Mikrokernen nimmt aufgrund dieses Effekts um 0,06 % bzw. 0,23 % zu. Dieser Anstieg ist zwar im Rahmen der Statistik der Simulation signifikant, die Größe von weniger als ein Prozent liegt jedoch weit unterhalb der Messgenauigkeit des Experiments. Insbesondere können die gemessenen Anstiege der Aberrationshäufigkeit von 19 % für Mikrokerne beziehungsweise 63 % für dizentrische Chromosomen hiermit nicht erklärt werden.

5.3.4 Dispersionsindizes der Häufigkeitsverteilungen

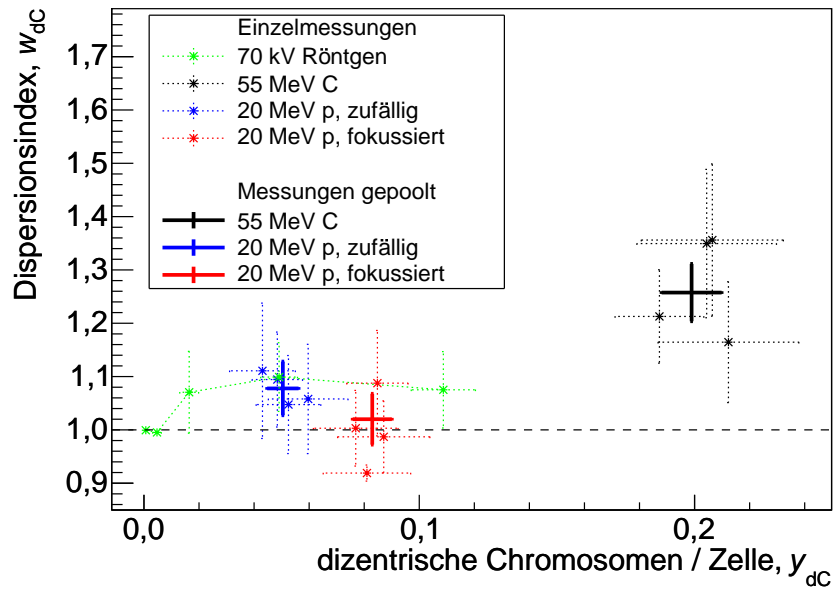
Chromosomenaberrationen in einer Zelle sind normalerweise seltene Ereignisse und die Häufigkeitsverteilung der Aberrationen folgt zumindest näherungsweise der Poisson-Statistik [Vir81]. Der Mittelwert der Poisson-Verteilung ist gleich der Varianz und der Dispersionsindex, der Quotient aus Varianz und Mittelwert, somit gleich eins. Verschiedene Effekte können jedoch, wie in 2.2.1 diskutiert, zu Abweichungen hiervon führen.

In Abb. 5.5 sind die Dispersionsindizes der Häufigkeitsverteilungen der gemessenen Chromosomenaberrationen gegen die Mittelwerte der Häufigkeitsverteilungen aufgetragen.

Die statistische Behandlung der Unsicherheiten der Dispersionsindizes gestaltet sich schwierig. Die übliche Vorgehensweise in der Literatur ist zu testen, ob die gemessenen Verteilungen mit der Poisson-Statistik verträglich sind. Hierzu wird meist der in [Sch95] beschriebene Test verwendet. Dieser Test liefert aber keine Aussage über die statistische Unsicherheit des gemessenen Dispersionsindex und erlaubt auch keine Aussage bezüglich der Frage, ob sich zwei gemessene Dispersionsindizes signifikant unterscheiden. Folgen die Messdaten nicht der Poisson-Statistik ist eine analytische Behandlung schwierig, da die zugrunde liegende Verteilungsfunktion im allgemeinen nicht bekannt ist. Zur Abschätzung der Unsicherheiten und damit der Fehlerbalken in Abb. 5.5 wurden sogenannte Bootstrapmethoden verwendet, wie sie in [Efr86] beschrieben sind. Dazu wird die zugrunde liegende, unbekannte Verteilungsfunktion mit der gemessenen Verteilung approximiert. Aus dieser approximierten Verteilung werden dann (computerbasiert) wiederholt durch Ziehen einzelner Elemente (mit Zurücklegen) Verteilungen gleicher Größe wie die gemessene Verteilung generiert und für jede so generierte Verteilung der Dispersionsindex bestimmt. Die Standardabweichung der



(a) Mikrokerne



(b) dizentrische Chromosomen

Abbildung 5.5: Aufgetragen ist jeweils der Dispersionsindex der gemessenen Verteilung gegen den Mittelwert dieser für die Induktion von Mikrokerneln (a) bzw. dizentrischen Chromosomen (b). Die Sternchen mit gestrichelten Fehlerbalken markieren die Einzelmessungen, die dicken Linien die gepoolten Daten aller im selben Modus bestrahlten Proben. Grau dargestellt sind die Daten der Dosiseffektkurve nach 0, 0,5, 1, 2 und 4 Gy Röntgenbestrahlung.

Dispersionsindizes der so gewonnenen Verteilungen dient als Näherung der Unsicherheit des Dispersionsindex der gemessenen Verteilung.

Für die Mikrokerninduktion (Abb. 5.5a) nach Protonenbestrahlung und Röntgenbestrahlung, mit Ausnahme der höchsten Dosis und damit der größten Mikrokernhäufigkeit, liegen die Dispersionsindizes leicht über eins, wie es für diesen Endpunkt typisch ist [Hub94, Vra94]. Der Dispersionsindex nach zufälliger Protonenbestrahlung ist mit jenem nach Röntgenbestrahlung, welche zur selben Mikrokernhäufigkeit führt, verträglich. Der Dispersionsindex nach fokussierter Protonenbestrahlung ist leicht erhöht, die Ein-Sigma Fehlerbalken überlappen sich gerade nicht mehr. Für große Mikrokernhäufigkeiten, etwa 0,5 Mikrokern pro Zelle im Cytokinese Block, nimmt der Dispersionsindex sowohl für Kohlenstoff- als auch für Röntgenstrahlung ab, was typisch für einen Sättigungseffekt ist [Vra94, Wut98]. Hohe Mikrokernzahlen sind hier unterrepräsentiert, da zum einen die Wahrscheinlichkeit steigt, dass sich mehrere azentrische Fragmente in einem Mikrokern befinden, zum anderen eventuell stark geschädigte Zellen mit potenziell hoher Mikrokernanzahl im Zellzyklus verlangsamt sind oder die Mitose nicht abschließen können, so dass diese der Zählung entgehen. Vor allem ist der Dispersionsindex nach hoch-LET Kohlenstoffbestrahlung nahezu identisch mit dem Dispersionsindex nach niedrig-LET Röntgenbestrahlung, welche zur selben Mikrokernausbeute führt. Insbesondere zeigen die Daten keine Zunahme des Dispersionsindex für hoch-LET Strahlung. Der gegenüber zufällig verteilter Bestrahlung leicht erhöhte Dispersionsindex für fokussierte Protonen kann somit auch nicht als Anzeichen eines Übergangs der Stahlenwirkung zu für hoch-LET typischen Verhaltens gewertet werden.

Der Endpunkt der dizentrischen Chromosomen (Abb. 5.5b) ist deutlich weniger anfällig für diese Einflüsse, der Dispersionsindex nahe eins. Nur für die Kohlenstoffbestrahlung liegt dieser deutlich über eins, was typisch für hoch-LET Strahlung ist [Vir81, Edw79]. Ein Vergleichswert nach Röntgenbestrahlung mit entsprechend hoher Dosis, welcher zu einer ähnlich hohen Mikrokernausbeute führt, gibt es allerdings nicht. Somit ist nicht klar, ob die Erhöhung des Dispersionsindex nach Kohlenstoffbestrahlung als Merkmal von hoch-LET Strahlung zu werten ist oder auf die große Anzahl dizentrischer Chromosomen zurückzuführen ist. Der Dispersionsindex nach fokussierter Protonenbestrahlung ist etwas kleiner als nach zufällig verteilter Protonenbestrahlung oder Röntgenbestrahlung. Der Unterschied ist aber nicht signifikant.

Insbesondere lassen die Dispersionsindizes sowohl für die Induktion von Mikrokernen als auch die Induktion von dizentrischen Chromosomen nach fokussierter Protonenbestrahlung keine typischen Merkmale für hoch-LET Strahlung erkennen.

5.4 Modellierung mit dem Local Effect Model

Die durchgeführten Messungen zeigen eine erhöhte Wirksamkeit für fokussierte Protonenbestrahlung gegenüber zufällig verteilt applizierten Protonen, obwohl dieselben Ionen und die selbe Dosis appliziert wurden. Durch die Fokussierung wird die Dosisverteilung künstlich modifiziert und deutlich inhomogener. Im Rahmen des Local Effect Models bildet gerade diese räumliche Dosisverteilung die Grundlage für erhöhte RBE-Werte von hoch-LET Strahlung (vgl. 2.4.1). Deshalb soll im Folgenden das Local Effect Model III [Els08] auf die modifizierte Dosisverteilung nach fokussierter Protonenbestrahlung, sowie auf zufällig verteilte Protonen und auf Kohlenstoffmatrixbestrahlung angewendet werden und die Vorhersagen für die Induktion von Chromosomenaberrationen mit den durchgeführten Messungen aus 5.3.1 verglichen werden.

Wie in 2.4.1 beschrieben bildet die räumliche Dosisverteilung die Basis der Rechnungen mit dem Local Effect Model. Anhand dieser wird mittels einer Dosiseffektbeziehung die räumliche Effektdichteverteilung berechnet, der Gesamteffekt ergibt sich als Integral dieser über den gesamten Zellkern.

Für die in den Experimenten verwendete Geometrie genügt es, die zweidimensionale Dosisverteilung auf einem $5,4\,\mu\text{m} \times 5,4\,\mu\text{m}$ großen Quadrat zu betrachten: Die LET-Änderung von 55 MeV Kohlenstoffionen innerhalb eines $7\,\mu\text{m}$ hohen Zellkerns liegt unter 3 %, die Änderung für 20 MeV Protonen unter 0,1 %. Somit ist die zu erwartende Dosisverteilung in guter Näherung translationsinvariant in Strahlrichtung und eine zweidimensionale Betrachtung ausreichend. Aufgrund der Symmetrie des quadratischen Bestrahlungsmusters mit einem Punktabstand von $5,4\,\mu\text{m}$ ist die Dosisverteilung auf einem $5,4\,\mu\text{m} \times 5,4\,\mu\text{m}$ großen Quadrat repräsentativ für die zu erwartende Dosisverteilung. Insbesondere kann so auf eine Bestimmung der effektiven Zellkerngröße (vgl. 2.4.1) für die Modellierung verzichtet werden.

Die konkrete Berechnung der Dosisverteilung wird mit einer Pixelgröße von 4 nm durchgeführt. Für die Matrixbestrahlung mit Kohlenstoff oder Protonen werden die Trefferpunkte der entsprechenden Anzahl von Ionen pro Punkt an nur einem Gitterpunkt zufällig einer Gausverteilung folgend gewürfelt, für die zufällige Protonenbestrahlung werden die Trefferpunkte der der Dosis entsprechenden Anzahl von Protonen in dem betrachteten Quadrat gleichverteilt gewürfelt und die Dosisbeiträge jedes Ions an jedem Pixel aufsummiert. Mittels des Konzepts der periodischen Randbedingungen werden Dosisbeiträge außerhalb des betrachteten Quadrats durch Verschiebung um ein Vielfaches der Kantenlänge von $5,4\,\mu\text{m}$ innerhalb des betrachteten Quadrats berücksichtigt und kompensieren so die nicht berücksichtigten Dosisbeiträge von Ionentreffern außerhalb.

Aus der Dosisverteilung folgt der Gesamteffekt durch Integration der lokalen Ef-

fektdichte, welche durch die Dosiseffektbeziehung nach Röntgenbestrahlung gegeben ist. Im Gegensatz zu der Darstellung in 2.4.1 soll nicht das Zellüberleben bzw. die Wahrscheinlichkeit für letale Ereignisse beschrieben werden, sondern die Häufigkeit von Chromosomenaberrationen. Die hierfür gemessenen Dosiseffektkurven können aufgrund des zusätzlichen konstanten Terms, c , in Gl. 5.1 nicht mit der Dosiseffektkurve des Local Effect Models aus Gl. 2.21 beschrieben werden. Deshalb wurde zur Beschreibung von Chromosomenaberrationen folgende angepasste Dosiseffektkurve verwendet:

$$y(D) = \begin{cases} c + \alpha D + \beta D^2 & D < D_t \\ (\alpha + 2\beta D_t) \eta(D) D + c - \beta D_t^2 & D > D_t \end{cases} \quad (5.2)$$

Diese entspricht mit Ausnahme des konstanten Terms, c , Gl. 2.21. Ab der Schwellendosis, D_t , ist die Dosiseffektbeziehung linear, wobei der Übergang bei D_t stetig differenzierbar ist. Der Dosisverstärkungsfaktor trägt der überproportionalen Zunahme an Doppelstrangbrüchen durch nahe beieinanderliegende Einzelstrangbrüche Rechnung.

Die Anwendung des Dosisverstärkungsfaktors, $\eta(D)$, setzt allerdings voraus, dass die Einzelstrangbrüche, welche zusammen einen Doppelstrangbruch bilden, auf einer Zeitskala induziert werden, welche kleiner ist als die Zeitskala der Einzelstrangbruchreparatur. Anderenfalls wäre der erste Einzelstrangbruch schon repariert, bevor der zweite induziert wird und die Bildung eines Doppelstrangbruchs auf diesem Wege wäre nicht mehr möglich. Signifikante Beiträge liefert der Dosisverstärkungsfaktor erst bei hohen Dosen, bei 10^3 Gy beträgt dieser 1,1, bei 10^4 Gy liegt dieser bei 2. Für Bestrahlungen mit Kohlenstoffionen sind solche Dosen nur im Zentrum der Ionenspur zu erwarten. Dort wird die Dosis im Wesentlichen durch ein Ion und damit, auf der Zeitskala der Einzelstrangbruchreparatur, gleichzeitig deponiert. Im Zentrum einer 20 MeV Protonenspur beträgt die maximale Dosis 117 Gy. Deutliche Beiträge durch den Dosisverstärkungsfaktor sind, wenn überhaupt, erst durch den räumlichen Überlapp der Dosisverteilungen vieler Protonen zu erwarten, nicht aber bei zufällig verteilter Bestrahlung. Im Falle der fokussierten Protonenbestrahlung werden die 117 Protonen pro Matrixpunkt bei einer experimententypischen Teilchenrate von 50 kHz bis 100 kHz in etwa ein bis zwei Millisekunden appliziert, was deutlich kürzer ist als die Zeitskala der Einzelstrangbruchreparatur von etwa einer Minute [Dik93]. Die Anwendung des Dosisverstärkungsfaktors scheint somit für alle drei Bestrahlungsmodi gerechtfertigt zu sein.

Die Schwellendosis, D_t , für die Dosiseffektkurve wurde so angepasst, dass der RBE nach Bestrahlung mit zufällig verteilten Protonen durch das Local Effect Model reproduziert wird. Abb. 5.6 zeigt sowohl für Mikrokerne als auch für dizentrische Chromosomen zum einen den gemessenen RBE nach zufällig verteilter Protonenbestrahlung, zum anderen den mit dem Local Effect Model berechneten RBE für die selbe Bestrah-

lung in Abhängigkeit der Schwellendosis, D_t . Mit $D_t = 6$ Gy können die gemessenen RBE–Werte nach zufällig verteilter Protonenbestrahlung reproduziert werden. Dieser Wert für D_t wird auch für die im folgenden dargestellten Rechnungen verwendet.

Abb. 5.7 zeigt den RBE für beide Endpunkte gegen die Fokusgröße des Protonenstrahls. Die gemessenen RBE–Werte nach fokussierter Protonenapplikation sind bei einer Fokusgröße von $(0,65 \pm 0,35)$ μm eingetragen. Zudem sind die gemessenen RBE–Werte als auch die Ergebnisse der LEM–Rechnung für 55 MeV Kohlenstoff eingetragen.

Aufgrund der Wahl der Schwellendosis, D_t , stimmt der Grenzwert großer Fokussdurchmesser mit der Messung nach quasihomogener Protonenbestrahlung überein. Im Grenzwert kleiner Fokussdurchmesser sagt das Local Effect Model eine Zunahme der relativen biologischen Wirksamkeit bis auf 1,8 für die Induktion von Mikrokernen bzw. 2,1 für dizentrische Chromosomen voraus. Die RBE–Werte nach Kohlenstoffbestrahlung liegen nochmals deutlich höher.

Zusätzlich ist in Abb. 5.7 der RBE der Doppelstrangbruchinduktion (schwarze Punkte) unter Verwendung des Dosisverstärkungsfaktors, $\eta(D)$ (vgl. 2.4.1) eingetragen. Dieser Faktor beschreibt die überproportionale Erzeugung von Doppelstrangbrüchen durch nahe beieinanderliegende Einzelstrangbrüche. Die Kurve beschreibt somit, unter Vernachlässigung möglicher weiterer nichtlinearer Erzeugungsmechanismen, den RBE

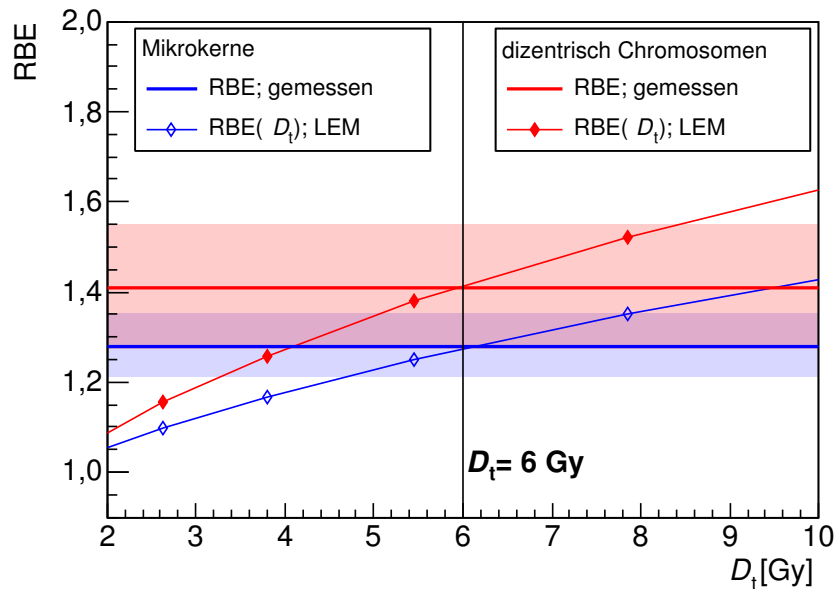


Abbildung 5.6: Dargestellt ist der mittels des Local Effect Models berechnete RBE für Mikrokerne (blaue Rauten) und dizentrische Chromosomen (rote Rauten) nach Bestrahlung mit zufällig verteilten 20 MeV Protonen in Abhängigkeit der Schwellendosis, D_t . Die transparenten Zonen markieren die Konfidenzintervalle der gemessenen RBE–Werte. Mit $D_t = 6$ Gy kann der gemessenen RBE für beide Endpunkte reproduziert werden.

für Doppelstrangbrüche. Für fokussierte 20 MeV Protonen zeigt dieser erst bei einer Strahlspotgröße zwischen 100 nm und 10 nm einen merkbaren Anstieg von 1 auf maximal 1,19, wohingegen der RBE für einzelne Kohlenstoffionen bei 1,96 liegt. Trotz gleicher Energiedeposition ist die Dosisverteilung von 117 Protonen auch bei verschwindender Strahlfleckgröße von einzelnen 55 MeV Kohlenstoffionen verschieden. Aufgrund der höheren Geschwindigkeit ist die Dosisverteilung radial weiter ausgedehnt und die maximale Dosis im zentralen Bereich um die Ionenspur, wegen der intrinsischen Normierung auf den LET, deutlich geringer. Die maximale Dosis für 55 MeV Kohlenstoff liegt bei 58 kGy, für einzelne 20 MeV Protonen bei 128 Gy, für 117 Protonen bei 15 kGy. Die nichtlineare Dosis–Doppelstrangbruchbeziehung führt somit im Rahmen des Local Effect Models zu etwa 65 % mehr Doppelstrangbrüchen für die verwendeten Kohlenstoffionen im Vergleich zu fokussierten 20 MeV Protonen bei verschwindendem Fokusdurchmesser.

Insbesondere liegt der RBE für Doppelstrangbruchinduktion bei einem Fokusdurchmesser von 300 nm bei nur 1,02 und kann die Erhöhung des RBE für Chromosomenaberrationen nach fokussierter Protonenbestrahlung nicht erklären. Somit muss diese

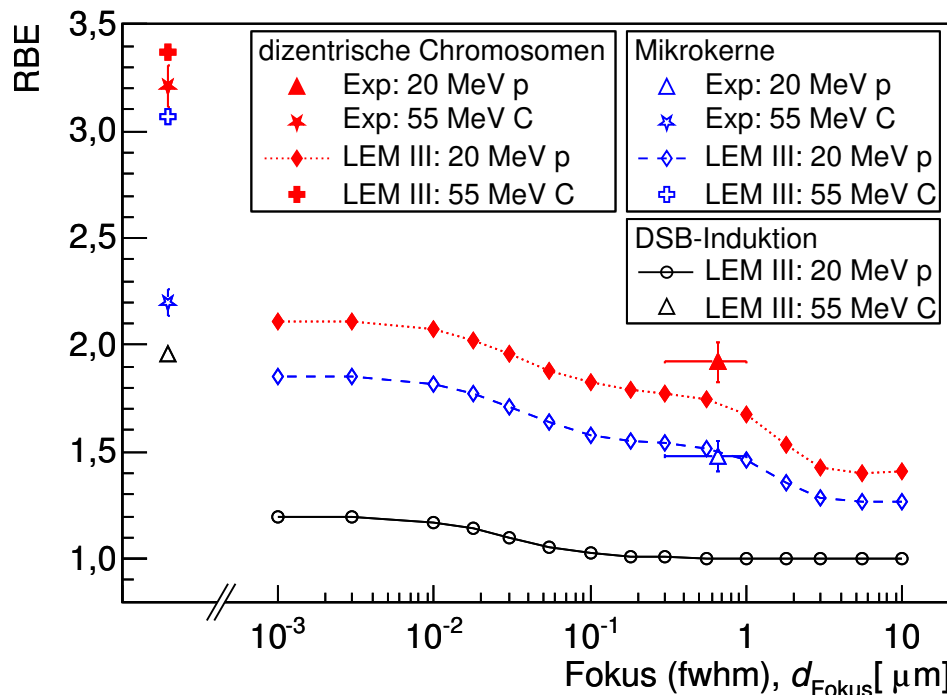


Abbildung 5.7: Dargestellt sind die Ergebnisse der Local Effect Model Rechnung. Die Raute zeigen die Vorhersage des LEM III für die relative biologische Wirksamkeit bezüglich der Induktion von Mikrokernen (offene blaue Symbole) und dizeintrischen Chromosomen (gefüllte rote Symbole) nach Bestrahlung mit fokussierten Protonen in Abhängigkeit des Fokusdurchmessers. Die Kreuze zeigen die Vorhersagen nach Kohlenstoffbestrahlung. Mit Sternen und Dreiecken sind die Messergebnisse der beiden Bestrahlungsmodi eingezeichnet.

Erhöhung auf die inhomogene und hierdurch lokal erhöhte Doppelstrangbruchdichte zurückgeführt werden.

Die Induktion von dizentrischen Chromosomen nach fokussierter Protonenbestrahlung wird durch die Rechnung leicht unterschätzt, nach Kohlenstoffbestrahlung leicht überschätzt. Die LEM-Rechnung liegt in beiden Fällen allerdings innerhalb der doppelten Messunsicherheit.

Für den Endpunkt der Mikrokerninduktion kann die Rechnung den RBE für fokussierte Protonenbestrahlung innerhalb der Messunsicherheit reproduzieren, während der RBE für die hoch-LET-Strahlung, 55 MeV Kohlenstoffionen, deutlich überschätzt wird. Nach [Els10] zeigt das Local Effect Model in den Versionen I–III die Tendenz die Wirkung bei niedrigem LET zu überschätzen, was im Gegensatz zur hier beobachteten Überschätzung bei hoch-LET Strahlung steht.

Das Hauptziel der Entwicklung des Local Effect Models war und ist bis heute die Beschreibung des klonogenen Zellüberlebens nach Schwerionenbestrahlung, welches die wesentliche Eingangsgröße bei der Therapieplanung mit Schwerionen darstellt. Auch wenn das LEM schon zur Beschreibung der LET-Abhängigkeit anderer Endpunkte verwendet wurde (vgl. z.B. [Sch96a]), verwundert es unter diesen Gesichtspunkten nicht, dass es zur quantitativen Beschreibung von Chromosomenaberrationen, vor allem der Induktion von Mikrokernen in A_L -Zellen, nicht geeignet ist.

Zum einen verwendet das LEM die auf Zellebene gemessene Dosiseffektkurve nach Röntgenbestrahlung zur Berechnung der lokalen Effektdichte. Für Chromosomenaberrationen zeigt die Dosiseffektkurve bei Dosen jenseits von einigen Gray ein Sättigungsverhalten (vgl. 2.2.1). Für den Endpunkt der Mikrokerninduktion ist vor allem die Beeinträchtigung des Zellzyklus aufgrund der Schädigung relevant, weshalb stark geschädigte Zellen mit potenziell vielen Mikrokernen eventuell die Mitose nicht abschließen und so nicht beobachtet werden können. Desweiteren steigt mit zunehmender Anzahl von azentrischen Fragmenten die Wahrscheinlichkeit mehrere dieser Fragmente in einem Mikrokern zu finden. [Vra94, Wut98]. Dieses Sättigungsverhalten ist in Abb. 5.5a für den Endpunkt der Mikrokerninduktion durch den reduzierten Dispersionsindex bei hohen Ausbeuten zu erkennen. Es ist zu vermuten, dass diese Effekte die „wahre“ lokale Dosiseffektbeziehung maskieren und so die Äquivalenz der Dosiseffektbeziehung auf Zellebene nach Röntgenbestrahlung mit der lokalen Effektbeziehung nicht gegeben ist.

Für die Modellierung des RBE mit dem Local Effect Model muss die gemessene Dosiseffektbeziehung um bis zu vier Größenordnungen extrapoliert werden um den Effekt bei Dosen von bis zu 58 kGy im Zentrum der Ionenspur von 55 MeV zu beschreiben. Diese Extrapolation ist beim Endpunkt der Chromosomenaberrationen besonders kritisch, da ein einsetzender Sättigungseffekt unter Umständen mit einem reduzier-

ten quadratischen Term der Dosiseffektbeziehung kompensiert werden kann und so die wahre Größe des quadratischen Terms maskiert.

Auf der anderen Seite sind die Endpunkte der Chromosomenaberrationen recht komplex. Es sind mindestens zwei Doppelstrangbrüche auf zwei unterschiedlichen Chromosomen notwendig, welche räumlich nahe genug beieinanderliegen müssen, damit sich die falschen Enden verbinden können. Somit ist auch die räumliche Korrelation der Dosisverteilung von Bedeutung, welche vom Local Effect Model bis Version III jedoch nicht berücksichtigt wird. Es werden lediglich die vorkommenden Dosiswerte berücksichtigt. Die aktuelle Version des Local Effect Models (IV) [Fri12] verwendet als Maß die Häufigkeitsverteilung von Doppelstrangbrüchen in Würfeln von 540 nm Kantenlänge, wobei die Doppelstrangbruchdichte aus der Dosisverteilung berechnet wird. Diese Berücksichtigung der räumlichen Dosisverteilung lässt eine bessere Beschreibung erwarten. Diese Rechnungen konnten aber im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr durchgeführt werden.

5.5 Diskussion

Räumlich fokussierte Dosisapplikation von 20 MeV Protonen zeigt bezüglich der betrachteten Endpunkte, der Induktion von Mikrokernen und dizentrischen Chromosomen, eine signifikant erhöhte Wirksamkeit im Vergleich zu zufällig verteilter Protonenbestrahlung. Die gemessene Wirksamkeit liegt allerdings deutlich unter jener von 55 MeV Kohlenstoffionen, welche im selben Matrixmuster und mit selber Energiedeposition pro Punkt und gleicher mittlerer Dosis appliziert wurden. Analoges gilt auch für die relativen biologischen Wirksamkeiten.

Der Versuchsaufbau, insbesondere die Lage der Zellkerne relativ zur Strahlrichtung, ist für alle drei Ionenapplikationsmodi identisch. Ein unterschiedlicher Einfluss der Bestrahlungsgeometrie auf die Induktion von Chromosomenaberrationen, wie in [Dur10] berichtet, kann somit ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der in 5.3.3 durchgeführten Monte-Carlo-Simulation zeigen zudem, dass die etwas größere Dosisvariation, welche aus der Matrixbestrahlung resultiert, kaum Auswirkung auf die Anzahl der Chromosomenaberrationen pro Zelle hat. Die Auswirkungen liegen im Bereich von wenigen Promill und sind somit im Vergleich zur Zunahme der Mikrokerne um 19 % bzw. der dizentrischen Chromosomen um 63 % zu vernachlässigen.

Die gemessene Zunahme von Chromosomenaberration nach Bestrahlung mit fokussierten Protonen ist somit auf die unterschiedliche räumliche Dosisverteilung der beiden Protonenbestrahlungsmodi zurückzuführen. Die durchgeführten Experimente stellen somit die erste direkte experimentelle Bestätigung der Annahme des Local Effect Models dar, wonach die räumliche Dosisverteilung für die relative biologische

Wirksamkeit maßgeblich ist.

Diese Messungen stehen im Widerspruch zu [Hil11], worin eine räumlich fraktionierte Bestrahlung mit 1,5 keV Röntgenstrahlung durch Verwendung einer Kupfermaske mit zufällig verteilten Löchern (Durchmesser $< 2\text{ }\mu\text{m}$) realisiert wurde. Die reduzierte Ausbeute an Chromosomenaberrationen wird dort mit der Tatsache erklärt, dass jeder Zellkern im Mittel durch 0,67 Löcher bestrahlt wird und somit jeder zweite Zellkern unbestrahlt bleibt. Die zufällige Verteilung der Trefferpunkte und die mittlere Trefferanzahl von deutlich kleiner eins verhindert den direkten Vergleich mit den hier durchgeführten Messungen mit Bestrahlung in einem regelmäßigen Muster und einer Trefferzahl von etwa vier pro Zellkern.

Abb. 5.1d zeigt die Umverteilung der Dosis bei fokussierter Protonenbestrahlung. Im Vergleich zu quasihomogener Protonenbestrahlung resultiert diese zum einen wegen des Überlapps der Ionenspuren in höheren Maximaldosen, zum anderen sind die Dosen nicht nur punktuell überhöht, sondern vor allem in einem Mikrometer großen zusammenhängenden Volumen.

Die LEM-Rechnung für die Induktion von Doppelstrangbrüchen durch nahe beieinanderliegende Einzelstrangbrüche zeigt, dass der zusätzlich induzierte DNA-Schaden klein ist. Für die untere Grenze der Fokusgröße liegt er bei etwa zwei Prozent und kann die gemessenen erhöhten RBE-Werte nicht erklären.

Durch die Fokussierung der Dosisapplikation wird auch die induzierte Doppelstrangbruchverteilung analog modifiziert. Die Doppelstrangbrüche rücken räumlich enger zusammen, der Abstand zwischen diesen sinkt. Mit abnehmendem Abstand steigt auch die Wahrscheinlichkeit, dass Enden von unterschiedlichen Brüchen miteinander Verknüpft werden, was zu der hier beobachteten erhöhten Wirksamkeit von fokussierter Dosisapplikation führt.

Kapitel 6

Ausblick

Die in Kap. 4 gemessenen Wachstumsverzögerungen nach Nanosekunden gepulster bzw. kontinuierlicher Protonenbestrahlung von menschlichen Tumoren im Mausmodell liefern keine Hinweise für eine deutlich veränderte Wirksamkeit von gepulsten Ionenstrahlen. Dies wird durch Experimente auf Einzelzellebene und im Gewebeverbund außerhalb dieser Arbeit unterstützt. Diese Messungen sind zur abschließenden strahlenbiologischen Qualifizierung von lasergetriebenen Ionenstrahlen zur Tumorthherapie bei weitem nicht ausreichend. Vor einer Anwendung in der Tumorthherapie sind natürlich weitere deutlich ausgedehntere Messreihen, wie etwa die Bestimmung der Tumorkontrolldosis, TCD_{50} , und Bestrahlungen an laserbeschleunigten Ionenstrahlen notwendig. Zusätzlich sind die Experimente mit deutlich größeren Fallzahlen durchzuführen um das für medizinische Anwendungen notwendige statistische Signifikanzniveau zu erreichen. Da die zur Tumorthherapie notwendigen Strahlparameter, vor allem die notwendigen Energien, aber auch die Stabilität und Reproduzierbarkeit von lasergetriebenen Systemen, noch nicht erreicht sind, kann über mögliche oder notwendige Bestrahlungsparameter, wie Dosisraten und pro Puls zu applizierenden Dosen, eines möglichen Anwendungsszenarios aktuell nur spekuliert werden. Unter diesen Rahmenbedingungen und den Erkenntnissen dieser Arbeit ist eine große Tierversuchsreihe ethisch nicht vertretbar, so dass vorerst Experimente auf Zell- und Gewebeebene durchzuführen sind.

Die im zweiten Teil der Arbeit vorgestellten Messungen zeigen die erhöhte biologische Wirksamkeit von räumlich fokussierten niedrig-LET Protonenbestrahlungen. Durch die Submikrometer Fokussierung wird die Dosisverteilung räumlich ähnlich konzentriert wie bei schweren Ionen. In Zukunft soll dieses Modellsystem verwendet werden um den Einfluß der räumlichen Dosisverteilung auf den RBE quantitativ zu studieren und die Experimente mit Modellen und Simulationen für die relative biologische Wirksamkeit zu vergleichen. Die Modellierung des RBE hat vor allem für die Bestrahlungsplanung in der Tumorthherapie mit schweren Ionen Bedeutung. Der entscheidende Endpunkt ist hierbei das Zellüberleben, wofür folglich auch die ausgereiftesten Mo-

delle existieren. Ein Vergleich dieser Modelle setzt Zellüberlebensmessungen voraus, welche mit einem Mikrostrahl methodisch deutlich anspruchsvoller sind als die hier vorgestellten Messungen von Chromosomenaberrationen, da die in akzeptabler Zeit zu bestrahlende Fläche limitiert ist.

Zur Messung der Koloniebildungsfähigkeit müssen Zellen bestrahlt und der Anteil der Zellen bestimmt werden, welcher in der Lage ist, sich weiter zu teilen, also Kolonien bildet. Da die zu bestrahlende Fläche limitiert ist, können die Zellen nicht auf der zur Bestrahlung verwendeten Zellträgerfolie weiter wachsen, da sich dort die Kolonien nicht mehr unterscheiden ließen. Somit sind die Zellen nach Bestrahlung abzulösen und neu auszusäen, was jedoch unweigerlich mit Zellverlusten verbunden ist und die zu bestrahlende Zellanzahl erhöht. Für Zellüberlebensexperimente muss sichergestellt werden, dass zum einen eine ausreichende Anzahl von Zellen bestrahlt wird und zum anderen, dass alle Zellen, welche weiter prozessiert werden, bestrahlt sind.

Das aktuell verfolgte Konzept sieht vor, die für das Zellwachstum zur Verfügung stehende Fläche mechanisch mittels einer O-Ring Konstruktion auf etwa 30 mm^2 zu begrenzen. Um diese, für Mikrostrahlexperimente riesige, Fläche in akzeptabler Zeit von etwa 15 Minuten zu bestrahlen sind Protonenraten auf dem Target von etwa $5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ notwendig, welche zudem gezählt und verarbeitet werden müssen. Die notwendigen Strahlintensitäten konnten im letzten Jahr mittels einer hochbrillanten Multicusp Protonenquelle [Mos12] präpariert und erfolgreich mit dem in Kap. 3.3 beschriebenen Setup verarbeitet werden. In der letzten Strahlzeit (Mai 2013) konnte das mechanische Design zur Eingrenzung der Wachstumsfläche erfolgreich getestet werden, so dass erste Testexperimente durchgeführt werden konnten.

Ein weiterer ebenso wichtiger Schritt zum Vergleich der Experimente mit RBE-Modellen ist die Vermessung der Strahlfleckgröße, welche die räumliche Dosisverteilung bestimmt. Da bei den zur Messung von Zellüberleben notwendigen Ionenraten die typische Anzahl von 117 Protonen innerhalb von etwa $200 \text{ }\mu\text{s}$ appliziert wird, ist jedoch auch nur die Teilchenverteilung auf dieser Zeitskala von Bedeutung. Vibrationen oder Oszillationen des Strahls auf längeren Zeitskalen, wie die normalerweise limitierenden, zur Netzspannung phasenstarren 50 Hz Oszillationen sind hierbei unerheblich, da diese lediglich zu einer Verschiebung des Mittelpunkts der jeweiligen Verteilung führen. Folglich müssen zumindest die Daten zur Vermessung der Strahlfleckgröße auf dieser Zeitskala von $200 \text{ }\mu\text{s}$ gewonnen werden, was eine Strahlcharakterisierung mittels Abrastern bekannter Strukturen, z. B. STIM (vgl. [Bre96]), ausschließt. Standard Kernspurdetektoren wie CR-39 können 20 MeV Protonen aufgrund des niedrigen LET nicht nachweisen. Aktuell liegt der Fokus auf Verwendung von fluoreszierenden Kernspurdetektoren. Diese bestehen aus Aluminiumoxid mit Kohlenstoff und Magnesium dotiert und besitzen Farbzentren, welche strahleninduziert ihre Fluoreszenzeigenschaf-

ten ändern und hierdurch den Nachweis von ionisierender Strahlung erlauben [Syk10]. Die Auslese mittels konfokaler Mikroskopie erlaubt die Detektion einzelner 20 MeV Protonen mit Submikrometer Ortsauflösung [Osi13]. Eine erfolgreiche Messung der Protonenverteilung eröffnet unmittelbar die Möglichkeit Bestrahlungen mit unterschiedlichen Verteilungen durchzuführen und so gezielt unterschiedliche Dosisverteilungen zu simulieren.

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen entweder von nur räumlich oder von nur zeitlich fokussierter Dosisapplikation untersucht. Auf die Dosisdeposition von schweren Ionen treffen jedoch beide Charakteristika zu: die Dosisdeposition geschieht auf der Zeitskala der Durchflugszeit des Ions durch den Zellkern und die Dosis wird im Wesentlichen in einer kleinen Umgebung um die Spur deponiert. Die logische Fortsetzung der Experimente dieser Arbeit besteht in der Kombination beider Aspekte und der Präparation eines Nanosekunden gepulsten, Submikrometer großen Protonenstrahls für Zellbestrahlungsexperimente. Auch wenn die gepulste Dosisdeposition in der Modellierung von schweren Ionen aktuell nicht berücksichtigt wird und es derzeit auch keine experimentellen Anzeichen gibt, dass die gepulste Dosisdeposition die Wirksamkeit ändert, so ist ein Effekt in Kombination mit räumlich fokussierter Dosisdeposition dennoch nicht auszuschließen. Experimente mit einem räumlich und zeitlich fokussierten Protonenstrahl könnten Aufschluss geben, ob die zeitliche Komponente der Dosisdeposition in der Tat eine nur untergeordnete Rolle spielt.

Literaturverzeichnis

- [And09] K. Ando et al., *Biological characteristics of carbon-ion therapy*, Int. J. Radiat. Biol. **85** (2009) 715
- [Ass74] W. Assmann et al., *The Munich MP tandem*, Nucl. Instrum. Methods **122** (1974) 191
- [Aue11] S. Auer et al., *Survival of tumor cells after proton irradiation with ultra-high dose rates*, Radiat. Oncol. **6** (2011) 139
- [Bal00] F. Ballarini et al., *Stochastic aspects and uncertainties in the prechemical and chemical stages of electron tracks in liquid water: a quantitative analysis based on Monte Carlo simulations*, Radiat. Environ. Biophys. **39** (2000) 179
- [Beg80] A. Begg, *Analysis of growth delay data: potential pitfalls.*, T. Brit. J. Cancer Supp. **4** (1980) 93
- [Ben97] S. Bentzen et al., *Quantifying the position and steepness of radiation dose-response curves*, Int. J. Radiat. Biol. **71** (1997) 531
- [Bin12] J. Bin et al., *A laser-driven nanosecond proton source for radiobiological studies*, Appl. Phys. Lett. **101** (2012) 243701
- [Bou] F. Bourhaleb et al., <http://totlxl.to.infn.it/lem/> (Stand 31.05.2013)
- [Bre96] M. Breese et al., *Materials Analysis with a Nuclear Microprobe*, Wiley-InterScience (1996), ISBN 0-471-10608-9
- [Bul02] S. Bulanov et al., *Feasibility of using laser ion accelerators in proton therapy*, Plasma Phys. Rep. **28** (2002) 453
- [Bur09] C. Burgdorf, *Realisierung einer Scanfelderweiterung des Rasterionenmikroskops SNAKE zur Bestimmung relativer biologischer Wirksamkeiten mittels Zellüberleben*, Studienarbeit, Universität der Bundeswehr München (2009)

- [But67] J. Butts et al., *Theory of RBE for heavy ion bombardment of dry enzymes and viruses*, Radiat. Res. **30** (1967) 855
- [But03] M. Butson et al., *Radiochromic film for medical radiation dosimetry*, Mater. Sci. Eng. R **41** (2003) 61
- [Cha76] A. Chatterjee et al., *Microdosimetric structure of heavy ion tracks in tissue*, Radiat. Environ. Biophys. **13** (1976) 215
- [Che94] J. Chen et al., *Radially restricted linear energy transfer for high-energy protons: a new analytical approach*, Radiat. Environ. Biophys. **33** (1994) 181
- [CLS] *CLS Cell Line Service*,
http://www.cell-lines-service.de/content/e3969/e4722/e4734/index_ger.html
(Stand 22.05.2013)
- [Dai12] H. Daido et al., *Review of laser-driven ion sources and their applications*, Rep. Prog. Phys. **75** (2012) 056401
- [Dat02] G. Datzmann, *Aufbau und Charakterisierung des Hochenergie Rasterionenmikroskops SNAKE*, Doktorarbeit, TU München (2002)
- [Dem10] E. Demidenko, *Three endpoints of in vivo tumour radiobiology and their statistical estimation*, Int. J. Radiat. Biol. **86** (2010) 164
- [Dev11] S. Devic, *Radiochromic film dosimetry: Past, present, and future*, Phys. Medica **27** (2011) 122
- [Dik93] E. Dikomey et al., *Saturated and unsaturated repair of DNA strand breaks in CHO cells after X-irradiation with doses ranging from 3 to 90 Gy*, Int. J. Radiat. Biol. **64** (1993) 659
- [Dol90] G. Dollinger, *Kohlenstofffolien als Stripper für schwere Ionen*, Doktorarbeit, TU München (1990)
- [Dol09] G. Dollinger et al., *Nanosecond pulsed proton microbeam*, Nucl. Instrum. Meth. B **267** (2009) 2008
- [Dor12] D. Doria et al., *Biological effectiveness on live cells of laser driven protons at dose rates exceeding 10^9 Gy/s*, AIP Adv. **2** (2012) 011209
- [Dur10] M. Durante et al., *Influence of nuclear geometry on the formation of genetic rearrangements in human cells*, Radiat. Res. **174** (2010) 20

- [Edw79] A. Edwards et al., *Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution*, Radiat. Environ. Biophys. **16** (1979) 89
- [Efr86] B. Efron et al., *Bootstrap methods for standard errors, confidence intervals, and other measures of statistical accuracy*, Stat. Sci. **1** (1986) 54
- [Els07] T. Elsässer et al., *Cluster Effects within the Local Effect Model*, Radiat. Res. **167** (2007) 319
- [Els08] T. Elsässer et al., *Accuracy of the Local Effect Model for the Prediction of Biologic Effects of Carbon Ion Beams In Vitro and In Vivo*, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **71** (2008) 866
- [Els10] T. Elsässer et al., *Quantification of the relative biological effectiveness for ion beam radiotherapy: direct experimental comparison of proton and carbon ion beams and a novel approach for treatment planning*, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **78** (2010) 1177
- [For03] F. Foroudi et al., *Evidence-based estimate of appropriate radiotherapy utilization rate for prostate cancer*, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **55** (2003) 51
- [Fri12] T. Friedrich et al., *Calculation of the biological effects of ion beams based on the microscopic spatial damage distribution pattern*, Int. J. Radiat. Biol. **88** (2012) 103
- [Gre11] C. Greubel et al., *Scanning irradiation device for mice in vivo with pulsed and continuous proton beams*, Radiat. Environ. Biophys. **50** (2011) 339
- [Haa77] J. Haag et al., *Chromosomal aberrations in pig lymphocytes after neutron irradiation in vitro*, Radiat. Res. **70** (1977) 187
- [Hab04] V. Hable, *Untersuchung der Dynamik von DNA-Reparaturproteinen nach Bestrahlung lebender Zellen am Rasterionenmikroskop SNAKE*, Diplomarbeit, Technische Universität München (2004)
- [Hab11] V. Hable, *Echtzeitbeobachtung schneller Reaktionskinetiken in lebenden Zellen nach Ionenmikrobestrahlung*, Doktorarbeit, Universität der Bundeswehr München (2011)
- [Hau04] A. Hauptner et al., *Microirradiation of cells with energetic heavy ions*, Radiat. Environ. Biophys. **42** (2004) 237

- [Hau06a] A. Hauptner, *Mikroskopisch genaue Zellbestrahlung mit hochenergetischen Ionen*, Doktorarbeit, TU München (2006)
- [Hau06b] A. Hauptner et al., *Spatial Distribution of DNA double-strand breaks from ion tracks*, Mater. Sci. Eng. R **52** (2006) 59
- [Haw94] R. B. Hawkins, *A statistical theory of cell killing by radiation of varying linear energy transfer*, Radiat. Res. **140** (1994) 366
- [Haw03] R. B. Hawkins, *A microdosimetric-kinetic model for the effect of non-Poisson distribution of lethal lesions on the variation of RBE with LET*, Radiat. Res. **160** (2003) 61
- [Her05] R. Hertenberger et al., *The Stern-Gerlach polarized ion source for the Munich MP-tandem laboratory, a bright source for unpolarized hydrogen and helium ion beams as well*, Nucl. Instrum. Meth. A **536** (2005) 266
- [Hil11] M. Hill et al., *Chromosome aberration induction is dependent on the spatial distribution of energy deposition through a cell nucleus*, Radiat. Prot. Dosim. **143** (2011) 172
- [Hof12] K. M. Hofmann et al., *Laser-driven beam lines for delivering intensity modulated radiation therapy with particle beams*, J. Biophotonics **5** (2012) 903
- [Hub94] R. Huber et al., *Dose-response relationships of micronuclei in human lymphocytes induced by fission neutrons and by low LET radiations*, Mutat. Res./Fund. Mol. M. **306** (1994) 135
- [Ina10] T. Inaniwa et al., *Treatment planning for a scanned carbon beam with a modified microdosimetric kinetic model*, Phys. Med. Biol. **55** (2010) 6721
- [Kar12] L. Karsch et al., *Dose rate dependence for different dosimeters and detectors: TLD, OSL, EBT films, and diamond detectors*, Med. Phys. **39** (2012) 2447
- [Kas06] Y. Kase et al., *Microdosimetric measurements and estimation of human cell survival for heavy-ion beams*, Radiat. Res. **166** (2006) 629
- [KID12] *Krebs in Deutschland 2007/2008*, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 8. Auflage (2012), ISBN 978-3-89606-214-7
- [Kie86] J. Kiefer et al., *A model of ion track structure based on classical collision dynamics (radiobiology application)*, Phys. Med. Biol. **31** (1986) 1201

- [Kir10] D. Kirby et al., *LET dependence of GafChromic films and an ion chamber in low-energy proton dosimetry*, Phys. Med. Biol. **55** (2010) 417
- [Kle03] E. E. Klein et al., *Surface and buildup dose characteristics for 6, 10, and 18 MV photons from an Elekta Precise linear accelerator*, J. App. Clin. Med. Phys. **4** (2003) 1
- [Kra00] G. Kraft, *Tumor therapy with heavy charged particles*, Prog. Part. Nucl. Phys. **45** (2000) S473
- [Kra10] S. Kraft et al., *Dose-dependent biological damage of tumour cells by laser-accelerated proton beams*, New. J. Phys. **12** (2010) 085003
- [Küb01] A. Kübler et al., *Clinical effectiveness of m-THPC-PEG in a new xenogenic animal tumor model for human squamous epithelial carcinomas*, Mund-, Kiefer-und Gesichtschirurgie **5** (2001) 105
- [Led10] K. Ledingham et al., *Laser-driven particle and photon beams and some applications*, New. J. Phys. **12** (2010) 045005
- [Luo05] W. Luo et al., *Particle selection and beam collimation system for laser-accelerated proton beam therapy*, Med. Phys. **32** (2005) 794
- [Ma09] C. Ma et al., *US. Patent 2009/0050819 A1* (2009)
- [Mos12] M. Moser et al., *High brilliance multicusp ion source for hydrogen microscopy at SNAKE*, Nucl. Instrum. Meth. B **273** (2012) 226
- [Nak10] K. Nakamura et al., *Review of particle physics*, J. Phys. G Nucl. Partic. **37** (2010) 075021
- [Osi13] J.-M. Osinga et al., *High-Accuracy Fluence Determination in Ion Beams using Fluorescent Nuclear Track Detectors*, Radiat. Meas. (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.radmeas.2013.01.035>, im Druck
- [Pag02] H. Paganetti et al., *Relative biological effectiveness (RBE) values for proton beam therapy*, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **53** (2002) 407
- [Pan68] E. Pantelouris, *Absence of thymus in a mouse mutant*, Nature **217** (1968) 370
- [Pri99] K. Prise et al., *A study of endonuclease III-sensitive sites in irradiated DNA: Detection of α -particle-induced oxidative damage*, Carcinogenesis **20** (1999) 905

- [Pri01] K. Prise et al., *A review of studies of ionizing radiation-induced double-strand break clustering*, Radiat. Res. **156** (2001) 572
- [Ran72] S. Rangan, *A new human cell line FaDu from a hypopharyngeal carcinoma*, Cancer **29** (1972) 117
- [Rei04] P. Reichart et al., *Three-dimensional hydrogen microscopy in diamond*, Science **306** (2004) 1537
- [Rei12a] S. Reinhardt, *Detection of laser-accelerated protons*, Doktorarbeit, LMU München (2012)
- [Rei12b] S. Reinhardt et al., *Comparison of Gafchromic EBT2 and EBT3 films for clinical photon and proton beams.*, Med. Phys. **39** (2012) 5257
- [Roh84] L. Rohrer et al., *The four gap double drift buncher at Munich*, Nucl. Instrum. Methods **220** (1984) 161
- [Ros79] H. H. Rossi, *The role of microdosimetry in radiobiology*, Radiat. Environ. Biophys. **17** (1979) 29
- [Sav69] J. Savage et al., *Distortion hypothesis: an alternative to a limited number of sites for radiation-induced chromosome exchange*, J. Theor. Biol. **22** (1969) 493
- [Sav76] J. Savage, *Classification and relationships of induced chromosomal structural changes.*, J. Med. Genet. **13** (1976) 103
- [Sch75] W. Schmid, *The micronucleus test.*, Mutat. Res. **31** (1975) 9
- [Sch95] E. Schmid et al., *Comparison of γ -ray induced dicentric yields in human lymphocytes measured by conventional analysis and FISH*, Mutat. Res. Lett. **348** (1995) 125
- [Sch96a] M. Scholz, *Calculation of RBE for normal tissue complications based on charged particle track structure*, B. Cancer Radiother. **83** (1996) 50s
- [Sch96b] M. Scholz et al., *Track structure and the calculation of biological effects of heavy charged particles*, Adv. Space Res. **18** (1996) 5
- [Sch01] O. Schmelter, *Ein Rasterionenmikroskop für hochenergetische Ionen*, Doktorarbeit, TU München (2001)
- [Sch06] L. Schreiner, *Dosimetry in modern radiation therapy: limitations and needs*, Journal of Physics: Conference Series, volume 56, IOP Publishing (2006), 1

- [Sch09] T. Schmid et al., *No evidence for a different RBE between pulsed and continuous 20 MeV protons*, Radiat. Res. **172** (2009) 567
- [Sch10a] S. Schell et al., *Advanced treatment planning methods for efficient radiation therapy with laser accelerated proton and ion beams*, Med. Phys. **37** (2010) 5330
- [Sch10b] T. Schmid et al., *Relative biological effectiveness of pulsed and continuous 20 MeV protons for micronucleus induction in 3D human reconstructed skin tissue*, Radiother. Oncol. **95** (2010) 66
- [Sch11] T. Schmid et al., *The Effectiveness of 20 MeV Protons at Nanosecond Pulse Lengths in Producing Chromosome Aberrations in Human-Hamster Hybrid Cells*, Radiat. Res. **175** (2011) 719
- [Sch12] T. E. Schmid et al., *Low LET protons focused to submicrometer shows enhanced radiobiological effectiveness*, Phys. Med. Biol. **57** (2012) 5889
- [Sie10] C. Siebenwirth, *Tumorbestrahlung mit gepulsten und kontinuierlichen Protonen am Mausmodell*, Diplomarbeit, TU-München (2010)
- [Syk10] G. J. Sykora et al., *Photoluminescence study of photochromically and radiochromically transformed $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{C,Mg}$ crystals used for fluorescent nuclear track detectors*, Radiat. Meas. **45** (2010) 631
- [Tob71] C. Tobias et al., *Radiological physics characteristics of the extracted heavy ion beams of the bevatron*, Science **174** (1971) 1131
- [Var77] M. Varma et al., *Radial Dose, LET, and \bar{W} for ^{16}O Ions in N_2 and Tissue-Equivalent Gases*, Radiat. Res. **70** (1977) 511
- [Var80] M. Varma et al., *Energy Deposition in Nanometer Regions by 377 MeV/Nucleon Ions*, Radiat. Res. **81** (1980) 355
- [vdS73] G. van der Schans et al., *Contribution of various types of damage to inactivation of a biologically-active double-stranded circular DNA by gamma-radiation*, Int. J. Radiat. Biol. **23** (1973) 133
- [Vir81] R. Virsik et al., *Statistical interpretation of the overdispersed distribution of radiation-induced dicentric chromosome aberrations at high LET*, Radiat. Res. **85** (1981) 13
- [Vra94] A. Vral et al., *Micronuclei induced by fast neutrons versus ^{60}Co γ -rays in human peripheral blood lymphocytes*, Int. J. Radiat. Biol. **65** (1994) 321

- [Wil46] R. Wilson, *Radiological use of fast protons*, Radiology **47** (1946) 487
- [Wut98] K. Wuttke et al., *The sensitivity of the in vitro cytokinesis-blocked micronucleus assay in lymphocytes for different and combined radiation qualities*, Strahlenther. Onkol. **174** (1998) 262
- [Xap92] M. Xapsos, *A spatially restricted linear energy transfer equation*, Radiat. Res. **132** (1992) 282
- [Yog11] A. Yogo et al., *Measurement of relative biological effectiveness of protons in human cancer cells using a laser-driven quasimonoenergetic proton beamline*, Appl. Phys. Lett. **98** (2011) 053701
- [Zie] J. Ziegler et al., *SRIM 2008*, www.srim.org (Stand 22.05.2013)
- [Zie99] J. Ziegler, *Stopping of energetic light ions in elemental matter*, J. Appl. Phys. **85** (1999) 1249

Publikationsliste

2006

1. METHODS FOR QUANTITATIVE EVALUATION OF DYNAMICS OF REPAIR PROTEINS WITHIN IRRADIATED CELLS
V. Hable, G. Dollinger, **C. Greubel**, A. Hauptner, R. Krücken, S. Dietzel, T. Cremer, G.A. Drexler, A.A. Friedl, R. Löwe, Nucl. Instr. Meth. B **245** (2006) 298
2. HYDROGEN MICROSCOPY AND ANALYSIS OF DNA REPAIR USING FOCUSED HIGH ENERGY ION BEAMS
G. Dollinger, A. Bergmaier, A. Hauptner, S. Dietzel, G.A. Drexler, **C. Greubel**, V. Hable, P. Reichart, R. Krücken, T. Cremer, A.A. Friedl, Nucl. Instr. Meth. B **249** (2006) 270
3. 3D HYDROGEN ANALYSIS OF FERROMAGNETIC MICROSTRUCTURES IN PROTON IRRADIATED GRAPHITE
P. Reichart, D. Spemann, A. Hauptner, A. Bergmaier, V. Hable, R. Hertenberger, **C. Greubel**, A. Setzer, G. Dollinger, D.N. Jamieson, T. Butz, P. Esquinazi, Nucl. Instr. Meth. B **249** (2006) 286
4. IRRADIATION OF LIVING CELLS WITH SINGLE IONS AT THE ION MICROPROBE SNAKE
A. Hauptner, T. Cremer, M. Deutsch, S. Dietzel, G.A. Drexler, **C. Greubel**, V. Hable, R. Krücken, R. Löwe, H. Strickfaden, G. Dollinger, A.A. Friedl, Acta Phys. Pol. A **109** (2006) 273
5. THE MUNICH MICROPROBE SNAKE, A SINGLE-ION CELL IRRADIATION FACILITY
C. Greubel, V. Hable, G. Dollinger, A. Hauptner, R. Krücken, H. Strickfaden, S. Dietzel, T. Cremer, G.A. Drexler, M. Deutsch, A.A. Friedl, Radiat. Res. **166** (2006) 654
6. RADIOBIOLOGICAL EXPERIMENTS AT THE MUNICH MICROPROBE SNAKE
A.A. Friedl, G.A. Drexler, M. Deutsch, H. Strickfaden, S. Dietzel, T. Cremer, A. Hauptner, R. Krücken, **C. Greubel**, V. Hable, G. Dollinger, Radiat. Res. **166** (2006) 668
7. DYNAMICS OF DNA REPAIR PROTEINS AFTER DIRECTED HEAVY-ION CELL IRRADIATION

V. Hable, G. Dollinger, **C. Greubel**, A. Hauptner, R. Krücken, S. Dietzel, T. Cremer, G.A. Drexler, A.A. Friedl, *Radiat. Res.* **166** (2006) 676

8. DNA-REPAIR PROTEIN DISTRIBUTION ALONG THE TRACKS OF ENERGETIC IONS.

A. Hauptner, R. Krücken, **C. Greubel**, V. Hable, G. Dollinger, G.A. Drexler, M. Deutsch, R. Löwe, A.A. Friedl, S. Dietzel, H. Strickfaden, T. Cremer, *Radiat. Prot. Dosim.* **122** (2006) 147

9. SPATIAL DISTRIBUTION OF DNA DOUBLE-STRAND BREAKS FROM ION TRACKS

A. Hauptner, W. Friedland, S. Dietzel, G.A. Drexler, **C. Greubel**, V. Hable, H. Strickfaden, T. Cremer, A.A. Friedl, R. Krücken, H.G. Paretzke, G. Dollinger, *Mat. Fys. Medd. Dan. Vid.* **52** (2006) 59

2008

10. QUANTITATIVE ANALYSIS OF DNA-DAMAGE RESPONSE FACTORS AFTER SEQUENTIAL ION MICROIRRADIATION

C. Greubel, V. Hable, G.A. Drexler, A. Hauptner, S. Dietzel, H. Strickfaden, I. Baur, R. Krücken, T. Cremer, A.A. Friedl, G. Dollinger, *Radiat. Environ. Biophys.* **47** (2008) 415

11. COMPETITION EFFECT IN DNA DAMAGE RESPONSE

C. Greubel, V. Hable, G.A. Drexler, A. Hauptner, S. Dietzel, H. Strickfaden, I. Baur, R. Krücken, T. Cremer, G. Dollinger, A.A. Friedl, *Radiat. Environ. Biophys.* **47** (2008) 423

12. RBE OF 20 MeV PROTONS FOR INDUCTION OF MICRONUCLEI IN HeLa CELLS AT CONTINUOUS AND PULSED IRRADIATION MODES

T.E. Schmid, G. Dollinger, A. Hauptner, V. Hable, **C. Greubel**, A.A. Friedl, M. Molls, B. Röper, *Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie* **17** (2008) 105

2009

13. NO EVIDENCE FOR A DIFFERENT RBE BETWEEN PULSED AND CONTINUOUS 20 MeV PROTONS

- T.E. Schmid, G. Dollinger, A. Hauptner, V. Hable, **C. Greubel**, S. Auer, A.A. Friedl, M. Molls, B. Röper, *Radiat. Res.* **172** (2009) 567
14. NANOSECOND PULSED PROTON MICROBEAM
G. Dollinger, A. Bergmaier, V. Hable, R. Hertenberger, **C. Greubel**, A. Hauptner, P. Reichart, *Nucl. Instr. Meth. B* **267** (2009) 2008
15. THE LIVE CELL IRRADIATION AND OBSERVATION SETUP AT SNAKE
V. Hable, **C. Greubel**, A. Bergmaier, P. Reichart, A. Hauptner, R. Krücken, H. Strickfaden, S. Dietzel, T. Cremer, G.A. Drexler, A.A. Friedl, G. Dollinger, *Nucl. Instr. Meth. B* **267** (2009) 2090

2010

16. RELATIVE BIOLOGICAL EFFECTIVENESS OF PULSED AND CONTINUOUS 20 MeV PROTONS FOR MICRONUCLEUS INDUCTION IN 3D HUMAN RECONSTRUCTED SKIN TISSUE
T.E. Schmid, G. Dollinger, V. Hable, **C. Greubel**, O. Zlobinskaya, D. Michalski, M. Molls, B. Röper, *Radiother. Oncol.* **95** (2010) 66
17. DIFFERENCES IN THE KINETICS OF γ -H2AX FLUORESCENCE DECAY AFTER EXPOSURE TO LOW AND HIGH LET RADIATION
T.E. Schmid, G. Dollinger, W. Beisker, V. Hable, **C. Greubel**, A.A. Friedl, M. Molls, B. Röper, *Int. J. Radiat. Biol.* **86** (2010) 682

2011

18. SCANNING IRRADIATION DEVICE FOR MICE IN VIVO WITH PULSED AND CONTINUOUS PROTON BEAMS
C. Greubel, W. Assmann, C. Burgdorf, G. Dollinger, G. Du, V. Hable, A. Hapfelmeier, R. Hertenberger, P. Kneschaurek, D. Michalski, M. Molls, S. Reinhardt, B. Röper, S. Schell, T.E. Schmid, C. Siebenwirth, T. Wenzl, O. Zlobinskaya, J.J. Wilkens, *Radiat. Environ. Biophys.* **50** (2011) 339
19. DIFFERENTIAL PROTON-PROTON SCATTERING CROSS SECTION FOR ENERGIES BETWEEN 1.9 MeV AND 50 MeV
M. Moser, P. Reichart, **C. Greubel**, G. Dollinger, *Nucl. Instr. Meth. B* **269** (2011) 2217

20. THE EFFECTIVENESS OF 20 MeV PROTONS AT NANOSECOND PULSE LENGTHS IN PRODUCING CHROMOSOME ABERRATIONS IN HUMAN-HAMSTER HYBRID CELLS
T.E. Schmid, G. Dollinger, V. Hable, **C. Greubel**, O. Zlobinskaya, D. Michalski, S. Auer, A.A. Friedl, E. Schmid, M. Molls, B. Röper, *Radiat. Res.* **175** (2011) 719
21. SPATIAL DYNAMICS OF DNA DAMAGE RESPONSE PROTEIN FOCI ALONG THE ION TRAJECTORY OF HIGH-LET PARTICLES
G. Du, G.A. Drexler, W. Friedland, **C. Greubel**, V. Hable, R. Krücken, A. Kugler, L. Tonelli, A.A. Friedl, G. Dollinger, *Radiation Research* **176** (2011) 706
22. DOUBLE-STRAND BREAK-INDUCED TRANSCRIPTIONAL SILENCING IS ASSOCIATED WITH LOSS OF TRI-METHYLATION AT H3K4
D.M. Seiler, J. Rouquette, V.J. Schmid, H. Strickfaden, C. Ottmann, G.A. Drexler, B. Mazurek, **C. Greubel**, V. Hable, G. Dollinger, T. Cremer, A.A. Friedl, *Chromosome Res.* **19** (2011) 883
23. SURVIVAL OF TUMOR CELLS AFTER PROTON IRRADIATION WITH ULTRA-HIGH DOSE RATES
S. Auer, V. Hable, **C. Greubel**, G.A. Drexler, T.E. Schmid, C. Belka, G. Dollinger, A.A. Friedl, *Radiat. Oncol.* **6** (2011) 139

2012

24. HIGH BRILLIANCE MULTICUSP ION SOURCE FOR HYDROGEN MICROSCOPY AT SNAKE
M. Moser, P. Reichart, W. Carli, **C. Greubel**, K. Peeper, P. Hartung, G. Dollinger, *Nucl. Instr. Meth. B* **273** (2012) 226
25. INDUCTION AND REPAIR OF DNA DOUBLE-STRAND BREAKS ASSESSED BY GAMMA-H2AX FOCI AFTER IRRADIATION WITH PULSED OR CONTINUOUS PROTON BEAMS
O. Zlobinskaya, G. Dollinger, D. Michalski, V. Hable, **C. Greubel**, G. Du, G. Multhoff, B. Röper, M. Molls, T.E. Schmid, *Radiat. Environ. Biophys.* **51** (2012) 23
26. ULTRAHIGH GAIN ALGAN/GAN HIGH ENERGY RADIATION DETECTORS
J.D. Howgate, M. Hofstetter, S.J. Schoell, M. Schmid, S. Schäfer, I. Zizak, V. Ha-

- ble, **C. Greubel**, G. Dollinger, S. Thalhammer, M. Stutzmann, I.D. Sharp, Phys. Status Solidi A **209** (2012) 1562
27. RECRUITMENT KINETICS OF DNA REPAIR PROTEINS MDC1 AND RAD52 BUT NOT 53BP1 DEPEND ON DAMAGE COMPLEXITY
V. Hable, G.A. Drexler, T. Brüning, C. Burgdorf, **C. Greubel**, A. Derer, J. Seel, H. Strickfaden, T. Cremer, A.A. Friedl, G. Dollinger, PLoS ONE **7** (2012) e41943
28. LOW LET PROTONS FOCUSED TO SUBMICROMETER SHOWS ENHANCED RADIOBIOLOGICAL EFFECTIVENESS
T.E. Schmid, **C. Greubel**, V. Hable, O. Zlobinskaya, D. Michalski, S. Girst, C. Siebenwirth, E. Schmid, M. Molls, G. Multhoff, Phys. Med. Biol. **57** (2012) 5889

2013

29. REDUCED SIDE EFFECTS BY PROTON MICROCHANNEL RADIOTHERAPY: STUDY IN A HUMAN SKIN MODEL
O. Zlobinskaya, S. Girst, **C. Greubel**, V. Hable, C. Siebenwirth, D.W. Walsh, G. Multhoff, J.J. Wilkens, T.E. Schmid, G. Dollinger, Radiat. Environ. Biophys. **52** (2013) 123

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Günther Dollinger, dem Leiter des Instituts LRT2, für die Unterstützung sowie intensive und kompetente Betreuung dieser Arbeit danken. Seine Ideen und sein klarer Blick für wissenschaftliche Zusammenhänge haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bedanken möchte ich mich bei meinen ehemaligen Kollegen in der SNAKE.bio Gruppe. Meinem langjährigen Weggefährten und Zimmergenossen seit Diplomarbeitszeit, Volker Hable, möchte ich für die hilfsbereite Zusammenarbeit während der Strahlzeiten, aber auch im Büroalltag, nicht nur bei Windowsproblemen, danken. Mit seinem Organisationstalent hat er mir viel Arbeit abgenommen. Eben solcher Dank gilt Andreas Hauptner für die Unterstützung in der Anfangszeit meiner Arbeit und für die Einführung in die Geheimnisse des Linserls. Mit seiner gewissenhaften und wohlüberlegten Arbeitsweise war er mir stets ein Vorbild. Danken möchte ich auch Guanghua Du für die Mithilfe (nicht nur) während der Strahlzeiten.

Besonderer Dank gilt meinen aktuellen Kollegen und Strahlzeitgenossen Christian Siebenwirth, Stefanie Girst und Judith Seel für die produktive und aufopferungsvolle Zusammenarbeit und den tollen Teamgeist während und zwischen den Strahlzeiten. Erstgenanntem gilt zusätzlich mein Dank für die gemeinsame Vorbereitung und Durchführung der Mausstrahlzeit und für die Auswertung von unzähligen Gafchrom Filmen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Andreas Bergmaier für die tatkräftige Unterstützung bei der Pulsbreitenvermessung, sowie bei Elektronik- und anderen Alltagsproblemen. Ebenso gilt mein Dank der pp-Gruppe, Patrick Reichart, Marcus Moser und Katrin Peeper für die Einführung in die hohe Kunst der Datenaufnahme während so mancher pp-Strahlzeit. Marcus Moser gilt besonderer Dank für die Begleitung meiner ersten Schritte mit der Multicusp-Quelle.

Dank gilt auch den unzähligen Kollaborationspartnern aus Biologie, Medizin

und Physik, die hier nur unvollständig aufgezählt werden können. Zuerst möchte ich mich bei Thomas Schmid und seiner Gruppe für die unkomplizierte Zusammenarbeit während der gesamten Arbeit bedanken, für die Präparation und Auswertung zahlreicher Zellproben und das Durchhaltevermögen bei der Entwicklung der Zellüberlebensmessungen. Dank gilt auch Ernst Schmid für das Auszählen unzähliger Chromosomenaberrationen als wesentliche Datenbasis für den zweiten Teil dieser Arbeit. Dank gilt auch Olga Zlobinskaya für die Zusammenarbeit während des Mausversuchs und vor allem für die Betreuung der Tiere. Danken möchte ich Jan Wilkens und seiner Gruppe für die Dosisplanung und die Röntgenbestrahlungen für den Mausversuch, sowie die fruchtbaren Diskussionen um die Mausbestrahlungen. Ebenfalls danken möchte ich Barbara Röper für das Einbringen ihrer Erfahrung, vor allem in der Anfangsphase des Mausprojekts. Mein besonderer Dank gilt Sabine Reinhardt und Walter Assmann für die Erarbeitung des Dosimetriekonzepts und der gemeinsamen Planung des Maushalters und das Scannen unzähliger Gafchromfilme während unserer Strahlzeiten. Ich möchte auch der Gruppe um Anna Friedl danken, vor allem Guido Drexler, Susanne Auer und Sophie Drexler für die konstruktive Zusammenarbeit bei der Planung der Strahlzeiten und für die logistische Meisterleistung der Organisation der Strahlzeiten. Mein besonderer Dank gilt Ralf Hertenberger für sein Engagement beim Betrieb seiner Protonenquelle als wesentliche Voraussetzung für die Tumorbestrahlungen.

Ganz besonderer Dank gilt allen Operateuren des Beschleunigers, allen voran Sigfried Koschartz und Walter Carli, für die aufopferungsvolle Arbeit während der Strahlzeiten. Selbst Quellenwechsel und ein Kettenriss konnten unsere Strahlzeiten nur zwischenzeitlich ausbremsen. Dank gilt auch Wolfgang Engl und Herrn Wieczorek in der LRT2-Werkstatt, sowie Fritz Haftlmeier und Georg Obermaier in der Beschleunigerwerkstatt für unzählige kurzfristige Anfertigungen und Abänderungen, meist „bis gestern“, aber auch für die Realisierung anspruchsvoller Konstruktionen. Spezieller Dank gilt auch der Rechnergruppe am Beschleuniger, Klaus Steinberger, Frederik Wagner, Rudi Lutter und Otto Schaile, für die zuverlässige IT-Infrastruktur und die Lösung von Rechner- und Windowsproblemen zu allen Tages- und Nachtzeiten.

Allen anderen Mitarbeitern, Kollegen und Kollaborationspartnern sei für die kleinen und großen Dinge des Alltags ebenfalls gedankt.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Schwestern, Neffen und meinem „Schwager“. Vor allem aber danke ich meinen Eltern für die große Unterstützung, die sie mir während meines Studiums und meiner Promotion zuteil werden ließen.